

สำนักหอสมุด มหาวิทยาลัยบูรพา  
ต.แสนสุข อ.เมือง จ.ชลบุรี 20131



รายงานวิจัย

การพัฒนาการผลิตสารออกฤทธิ์ชีวภาพจากแอคติโนมัยซีทและการผลิตเซลล์  
ปริมาณมาก.

Developmental production of bioactive compounds from actinomycetes and cell  
mass production.

ภายใต้แผนงานวิจัยเรื่อง

จุลินทรีย์ทะเล: แหล่งใหม่ของสารตัวยาและผลิตภัณฑ์เสริมอาหาร

รัตนภรณ์ ศรีวิบูลย์

172775

A6 010 7745

- 8 ม.ค. 2558

เริ่มบริการ

346963

18 ก.ค. 2558

ได้รับทุนอุดหนุนการวิจัยจากสำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ  
ผ่านงบประมาณแผ่นดิน ประจำปีงบประมาณ 2556  
สถาบันวิทยาศาสตร์ทางทะเล มหาวิทยาลัยบูรพา

## กิตติกรรมประกาศ

โครงการนี้ได้รับการสนับสนุนด้านงบประมาณจากสำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติผ่านงบประมาณแผ่นดินมหาวิทยาลัยบูรพาประจำปี 2556 ซึ่งผู้วิจัยใคร่ขอขอบพระคุณเป็นอย่างมาก ตลอดจนเจ้าหน้าที่สถาบันวิทยาศาสตร์ทางทะเลทุกท่านที่มีส่วนช่วยทำให้งานวิจัยฉบับนี้สำเร็จลุล่วงไปด้วยดี

## บทคัดย่อ

จากที่ได้คัดเลือกเชื้อแอสคิโนไมซีที่ที่สามารถสร้างสารออกฤทธิ์ยับยั้งจุลินทรีย์ และได้แยกเชื้อได้ใหม่ จากป้าชายเลน ใน อำเภอนนอม จังหวัดนครศรีธรรมราช มาศึกษาเพื่อพัฒนาการผลิตเซลล์ เพื่อการวิเคราะห์หาสารต้านอนุมูลอิสระ ปริมาณกรดไขมัน และเพื่อการหาสูตรโครงสร้างของสาร การศึกษาการเลี้ยงในอาหารชนิดต่าง ๆ และ ในอาหารที่มี pH ต่าง ๆ กันพบว่า ในอาหาร ISP2 เป็นอาหารที่แอสคิโนไมซีเจริญได้ดีเป็นส่วนใหญ่ และ pH ระหว่าง pH 7.5-8.0 เป็นช่วง pH ที่แอสคิโนไมซีสร้างสารออกฤทธิ์ได้ดีที่สุด แม้ในบางไอโซเลต pH ไม่มีผลต่อการสร้างสารก็ตาม แอสคิโนไมซีที่แยกเชื้อได้ใหม่นั้น รวมทั้งหมด 52 ไอโซเลต และในจำนวนนี้มี 27 ไอโซเลตที่สามารถสร้างสารออกฤทธิ์ยับยั้งจุลินทรีย์ (คิดเป็น 51.2%) การเลี้ยงแอสคิโนไมซีปริมาณมากเพื่อการวิเคราะห์สารต้านอนุมูลอิสระ และการวิเคราะห์กรดไขมัน ในโครงการที่ 3 และโครงการที่ 4 นั้น ได้ปริมาณเซลล์ (wet weight) รวมทั้งหมด 833.26 กรัม จากอาหารเลี้ยงเชื้อ 14.850 ลิตร จากจำนวนเชื้อแอสคิโนไมซีทั้งหมด 25 ไอโซเลต

ส่วนการศึกษาการเจริญของยีสต์ BS6-1 และ BS6-2 นั้น การเลี้ยงใน YM ซึ่งเป็นอาหารสำเร็จรูป ให้ปริมาณเซลล์ได้มากกว่า เมื่อเลี้ยงด้วยกากขานอ้อย ภายในเวลาที่เท่ากัน

## สารบัญ

	หน้า
บทที่ 1 บทนำ	1
2 ทบทวนเอกสาร	3
3 อุปกรณ์ และวิธีการวิจัย	6
4 ผลการวิจัย	8
5 สรุปและวิจารณ์ผล	22
เอกสารอ้างอิง	23
ภาคผนวก	24

## สารบัญตาราง

ตารางที่	หน้า	
1	สารผลิตภัณฑ์ธรรมชาติจากทะเลที่ได้จากฟองน้ำ และแบคทีเรีย(แอคติโนมัยซีท) ที่เป็นสารยับยั้งเซลล์มะเร็ง ที่อยู่ระหว่างการทดสอบ (Jimenez, et al., 2009)	4
2	แอคติโนมัยซีทที่ได้แยกเชื้อเพิ่มเติมจากป่าชายเลน ในจังหวัดนครศรีธรรมราช และฤทธิ์ชีวภาพยับยั้งจุลินทรีย์ที่สร้างได้	10
3	ผลการทดสอบการเจริญ และสีของรงควัตถุที่เปลี่ยนไป บนอาหารชนิดต่าง ๆ	14
4	ผลการศึกษาการสร้างสารออกฤทธิ์ยับยั้งจุลินทรีย์ของแอคติโนมัยซีทที่สร้างสารออกฤทธิ์ที่ดีในอาหารที่มี ค่า pH ต่าง ๆกัน โดยทดสอบฤทธิ์ยับยั้งเชื้อ MRSA และ <i>Candida albicans</i>	16
5	แอคติโนมัยซีทที่ได้คัดเลือกไว้และได้เลี้ยงเชื้อปริมาณมากเพื่อนำส่งโครงการที่ 3 และโครงการที่ 4 เพื่อการวิเคราะห์กรดมัน และสารแอนติออกซิแดนซ์	17

## สารบัญภาพ

ภาพที่	หน้า
1 การทดสอบเบื้องต้น ด้วยวิธี Cross streak technique ตรวจหาการสังเคราะห์ออกฤทธิ์ยับยั้งจุลินทรีย์	6
2 a และ b ฟองน้ำที่นำมาแยกเชื้อ c. ฟองน้ำที่ถูกตัดเป็นชิ้นเล็ก ๆ ก่อนนำมาแยกเชื้อ	8
3 แอคติโนมัยซีทบนจานเพาะเชื้อ จากป่าชายเลนนครศรีธรรมราช เกาะวังนอก และ เกาะราบใต้เขื่อนรา(RB-POR2-1)	9
4 ภาพจาก ภายใต้นกล้อง Scanning Electron Microscope ของ <i>Streptomyces</i> A1-3, A 3-3, <i>Streptomyces</i> CH54-5, PL3-3, PL3-7, NS3-10,NS4-3. NS4-6, , NS6-2, NS4-14, A16-1, A1-3 และ A3-3	12-13
5 การเจริญและการสังเคราะห์รงควัตถุ บนอาหารชนิดต่าง ๆ(ISP2,ISP3, ISP4, ISP5, Starch Casein) ของ แอคติโนมัยซีท A1-3 และ A3-3	15
6 การเจริญและการสังเคราะห์รงควัตถุ บนอาหารชนิดต่าง ๆของ แอคติโนมัยซีท A16-1, a: บน ISP, B: บน Actinomycete Isolation Agar, c: บน Starch Casein Agar, d: บน ISP5	15
7 ภาพยีสต์ BS6-2 ภายใต้นกล้อง Inverted Microscope เซลล์มีลักษณะกลม/ รูปไข่ขนาดใหญ่	18
8 การเจริญของเชื้อ BS 6-2 ในอาหารเลี้ยงเชื้อ YM	19
9 การเจริญของเชื้อ BS 6-2 ในอาหารเลี้ยงเชื้อกากขาน้อยใน SM30	19
10 การเจริญของเชื้อ BS 6-2 ในอาหารเลี้ยงเชื้อกากขาน้อยใน SM30 ที่ทำการกรองก่อนนำเข้า เครื่องหมักนึ่งความดันอัตโนมัติ	20

## บทที่ 1 บทนำ

เนื่องจากแบคทีเรียในกลุ่มแอคติโนมัยซีทมีการสร้างสารไบโอแอคทีฟเมตาโบไลต์ที่มีความหลากหลาย ที่ยังคงมีความสำคัญต่อการค้นหาสารแอนติไบโอติก หรือสารตัวยาคชนิดใหม่ ๆ ที่เป็นประโยชน์ต่อทางการแพทย์และเภสัชวิทยาอย่างต่อเนื่อง ตราบใดที่ที่ยังพบว่ามีเชื้อก่อโรคที่ดื้อยา ที่นับวันมีแต่จะทวีจำนวนมากขึ้นนับเป็นเรื่องที่ยังมีความสำคัญมากขึ้น ในหลาย ๆ รายงานพบว่าเชื้อแบคทีเรียก่อโรคที่ดื้อยาแอนติไบโอติคนั้นมีเพิ่มมากขึ้นจริง ในขณะที่อัตราการค้นพบหรือการพัฒนาสารแอนติไบโอติกที่มีประสิทธิภาพนั้นกลับลดลง (Nathan, 2004; Nussbaum, et al., 2006) ในบรรดาสารแอนติไบโอติกที่ใช้ในทางคลินิกนั้น สองในสามของมันก็ได้นำมาพบมาจากแหล่งธรรมชาติ และเป็นสารกึ่งสังเคราะห์ที่ดัดแปลงมาจากสารแอนติไบโอติกธรรมชาติอีกทีหนึ่ง (Newman and Cragg, 2007)

สำหรับสารออกฤทธิ์ที่ได้จากธรรมชาตินั้นสิ่งที่สำคัญคือ ก่อนที่จะมีการตรวจสอบชนิดของสารว่าเป็นสารกลุ่มไหน มีโครงสร้างทางเคมีอย่างไร เป็นชนิดใหม่หรือไม่นั้น ต้องการสารสำหรับการทดสอบเป็นปริมาณที่มากพอสมควร ซึ่งต้องมากพอสำหรับการทำให้สารบริสุทธิ์เบื้องต้น สำหรับการนำมาวิเคราะห์โครงสร้างและนำหนักโมเลกุล รวมทั้งนำสารแต่ละองค์ประกอบที่แยกได้จากสารสกัดหยาบมาทดสอบว่า องค์ประกอบใดคือสารที่ออกฤทธิ์ และออกฤทธิ์กับอะไรบ้าง จุลินทรีย์ หรือเซลล์มะเร็ง สารแต่ละองค์ประกอบที่ได้ต้องมากพอสำหรับการทดสอบการออกฤทธิ์แต่ละชนิด เนื่องจากในแต่ละขั้นตอนนั้นก็จะมีน้ำหนักมวลสารที่หายไปในแต่ละขบวนการของการวิเคราะห์ จึงต้องการเทคโนโลยีในการเลี้ยงเซลล์เพื่อการสร้างสารออกฤทธิ์ให้ได้ปริมาณมากพอสำหรับการวิเคราะห์ในแต่ละขั้นตอน

เนื่องจากเซลล์แบคทีเรียมีขนาดเล็ก ดังนั้นสารเมตาโบไลต์ที่สร้างขึ้นภายในเซลล์แต่ละเซลล์จึงมีปริมาณน้อยตามขนาดเซลล์ เฉพาะการจะวิเคราะห์โครงสร้างสารแต่ละชนิดอาจต้องใช้สารประมาณ 1-3 กรัม ขึ้นกับความสามารถของเครื่องมือวิเคราะห์ที่ใช้ นั่นหมายความว่าต้องใช้ปริมาณสารสกัดหยาบต่อชนิดเชื้อ ที่อาจมากถึง 2-10 ลิตร เท่าของน้ำหนักเซลล์โดยประมาณหากจะคิดว่า 1 เซลล์หนัก 1  $\mu\text{g}$  ในแบคทีเรียอาจต้องเลี้ยงเชื้อ ถึง 20-25 ลิตร เพื่อให้ได้สารสกัดหยาบ 1 กรัม ในเชื้อบางชนิด ดังนั้นการค้นหาวิธีที่จะได้เซลล์ปริมาณมากหรือเพื่อให้เซลล์ผลิตสารปริมาณมากจึงมีความสำคัญสำหรับขั้นตอนนี้

สำหรับมารีนีส์ต์เป็นราในกลุ่ม Ascomycetes หรือบางชนิดอยู่ในกลุ่ม Basidiomycetes ซึ่งมีคุณค่าอาหารภายในเซลล์ และองค์ประกอบของเซลล์สูง มีทั้งโปรตีน กรดไขมันไม่อิ่มตัว วิตามินบีหลายชนิด นอกจากนี้ยังพบว่าเซลล์ยีสต์ยังประกอบไปด้วยคาร์โบไฮเดรต กรดนิวคลีอิก รวมทั้งไขมันอื่น ๆ ดังนั้นจึงเหมาะสมที่จะใช้สำหรับเป็นอาหารเสริม และในการเลี้ยงเซลล์ยีสต์นั้นใช้เวลาสั้น และสามารถเลี้ยงได้โดยใช้วัตถุดิบที่อาจหาได้ง่าย เช่นกากน้ำตาล มันสำปะหลัง หางนม (Whey) มารีนีส์ต์หลายชนิดมีกรดไขมันไม่อิ่มตัวสูง เช่น (Polyunsaturated fatty acids, PUFAs) ซึ่งกรดไขมันเหล่านี้ เป็นกรดไขมันที่มีบทบาทสำคัญต่อสุขภาพของมนุษย์ โดยถูกนำมาใช้เป็นอาหารเสริม และใช้ในทางการแพทย์ โดยเฉพาะกลุ่มไขมันโอเมกา 3 ควบคุมการทำงานในร่างกายรวมทั้งความดันโลหิต ป้องกันเลือด

แข็งตัว การทำงานของระบบสมองและประสาท นอกจากนี้ยังพบว่า EPA และ DHA มีบทบาทในการควบคุมการตอบสนองการอักเสบผ่านการผลิตสารที่เรียกว่า eicosanoids (Oliver et al 2010) รวมทั้งยังนำมาใช้ในอุตสาหกรรมการผลิตอาหารสัตว์ ปัจจุบันเรามีการผลิตยีสต์ทั้งที่เป็นอาหารคนและอาหารสัตว์ ซึ่งผลิตได้โดยใช้ยีสต์หลายชนิด เช่น แคนดิดา *Candida utilis* หรือ *Saccharomyces* sp. การใช้ยีสต์ในอาหารของคนนั้น มักใช้เพื่อปรุงแต่ง เพิ่มกลิ่นรสของอาหาร เช่น ใช้เติมใน อาหารประเภทซูป หรืออาจใช้เป็นสารสกัดจากยีสต์ใช้ทาขนมปัง ส่วนการใช้ยีสต์ในอาหารสัตว์นั้น ส่วนใหญ่ใช้ในรูปอาหารเสริมโปรตีน และหากจะใช้เป็นอาหารของสัตว์ทะเลวัยอ่อน จะเลือกใช้ยีสต์ที่แยกได้จากทะเล หรือมารีนยีสต์ ซึ่งเป็นยีสต์ที่มีกรดไขมันที่มี polyunsaturated fatty acids สูง และไม่ทำให้คุณภาพน้ำเสีย (เหมือนการใช้ยีสต์ทำขนมปัง) เพื่อให้สัตว์น้ำวัยอ่อนเจริญเติบโตได้ดี เพื่อเป็นแหล่งของอาหารที่มีคุณประโยชน์และมีคุณค่าอาหารสูงต่อสัตว์ทะเลที่เป็นห่วงโซ่อาหารลำดับต่อไป และเช่นเดียวกันการใช้ประโยชน์เพื่อการนี้ก็ต้องผลิตยีสต์เพื่อให้ได้เซลล์เป็นปริมาณมากอย่างเพียงพอ

งานวิจัยนี้จึงมีวัตถุประสงค์เพื่อพัฒนาการผลิตสารแอนติไบโอติกจากแอคติโนมัยซีท ที่แยกได้จากฟองน้ำทะเล และ/หรือแยกได้จากตะกอนชายฝั่ง ให้ได้ปริมาณมากเพื่อใช้ในการวิจัยการวิเคราะห์โครงสร้างสาร และพัฒนาการผลิตเซลล์ของยีสต์ทะเล (marine yeasts) เพื่องานวิจัย และเพื่อการตรวจสอบคุณค่าอาหารและสารที่เป็นประโยชน์อื่น ๆ ของเซลล์ โดยการพัฒนาการผลิตสารแอนติไบโอติกจากแอคติโนมัยซีท และการผลิตเซลล์ ในการวิจัยนี้จะมุ่งเน้นที่ สารแอนติไบโอติกที่เป็นสารมีสี (pigment) จากแอคติโนมัยซีทที่แยกได้จากฟองน้ำทะเล และ/หรือ จากตะกอนชายฝั่งทะเล บริเวณอ่าวไทยตอนกลาง เพื่อใช้ในการวิเคราะห์โครงสร้างสารในการค้นหาสารแอนติไบโอติกใหม่ ๆ (ในโครงการวิจัยที่ 3) ที่อาจใช้เป็นองค์ประกอบหนึ่งของผลิตภัณฑ์ยา และการศึกษาองค์ประกอบของกรดไขมันภายในเซลล์ (ในโครงการวิจัยที่ 4) รวมทั้งการผลิตเซลล์ยีสต์ที่ได้จากทะเลด้วยวิธีการเลี้ยง กิ่งต่อเนื่อง เพื่อการตรวจสอบคุณค่าอาหารและองค์ประกอบอื่น ๆ เพื่องานวิจัยในเรื่องผลิตภัณฑ์อาหารเสริมของสัตว์น้ำวัยอ่อนในโครงการที่ 4 และ 6

## บทที่ 2 ทบทวนเอกสาร

ปัจจุบันความต้องการใช้ยาแอนติไบโอติกยังคงเพิ่มขึ้นเรื่อย ๆ トラบเท่าที่ยังมีเชื้อก่อโรคยังมีชีวิตอยู่ร่วมกันกับเรา และด้วยเหตุนี้การพัฒนาการผลิตสารแอนติไบโอติกจึงยังคงมีความสำคัญ แม้แต่สารแอนติไบโอติกประเภท  $\beta$ -lactam ที่มีใช้มาตั้งแต่สมัยแรกเริ่ม เช่น penicillins และ cephalosporins ก็ยังคงต้องการการพัฒนาสายพันธุ์ให้สามารถสร้างสารได้มากขึ้น การที่ *Penicillium chrysogenum* สามารถผลิตสาร penicillin ได้ประมาณ 200 เท่า ของ *Penicillium notatum* ก็มาจากการปรับปรุงสายพันธุ์ ในสมัย Fleming ที่เริ่มค้นพบ penicillin ครั้งแรกนั้น เชื้อ *Penicillium chrysogenum* ที่เขาใช้ก็สร้างสารไม่ได้มากนัก ต่อมาเมื่อมีการปรับปรุงแล้ว *P. chrysogenum* ที่ใช้อยู่ในปัจจุบันสามารถสร้างสารได้มากกว่า *P. chrysogenum* ของ Fleming ถึง 1000 เท่า (Veerapagu et al., 2008)

การวิจัยเกี่ยวกับแอกติโนมัยซีทในทะเลนั้น ในประเทศไทยยังมีการศึกษาน้อยมาก เนื่องจากข้อจำกัดหลาย ๆ ด้านหากนักวิจัย ไม่ได้มีห้องปฏิบัติการที่ใกล้ทะเล อย่งไรก็ดีพบว่ามึนหลายรายงานที่กล่าวถึงสารไบโอแอกทีฟเมตาโบไลต์ใหม่ ๆ ที่สำคัญที่พบได้จากแอกติโนมัยซีทในทะเล และพบว่าในทะเลนั้น แอกติโนมัยซีทที่เป็นชนิดดั้งเดิมที่มักพบบ่อย ได้แก่ *Rhodococcus*, *Streptomyces*, *Salinispora*, *Microphilus*, *Salinispora*, *Salinibacterium*, *Aeromicrobium marinum*, *Williamsia maris*, และ *Verrucosipora* (Bull et al., 2005; Jensen et al., 2005a; Jensen et al., 2005b; Fiedler, et al., 2005; Magarvey, et al., 2004 และ Stach et al., 2004) และจากรายงานของ Gandhimathia et al.(2007) พบว่า ในบรรดาแบคทีเรียที่อาศัยอยู่ร่วมกับฟองน้ำ *Callyspongia diffusa* นั้น พบถึง 38.46% ที่เป็น แอกติโนมัยซีท และแอกติโนมัยซีทชนิดที่เป็น endophytic นั้น จะเป็นชนิดที่สร้างสารแอนติไบโอติกยับยั้งการเจริญของเชื้อก่อโรคในคนได้ดีกว่าแอกติโนมัยซีททั่วไป โดยเฉพาะอย่างยิ่ง *Streptomyces* spp.

ตารางที่ 1 สารผลิตภัณฑ์ธรรมชาติจากทะเลที่ได้จากฟองน้ำ และแบคทีเรีย(แคคตินทรีย์ซีท) ที่เป็นสารยับยั้งเซลล์มะเร็ง  
ที่อยู่ระหว่างการทดสอบ (Jimenez, et al., 2009)

Compound	Probable biosynthetic route or compound type	Source organism	Clinical phase status
Bryostatin 1	Mixed PKS/NRPS	<i>Bugula neritina</i> (bryozoan)	III
Halichondrin B	PKS2	<i>Lissodendoryx</i> sp. (sponge)	I
Discodermolide	PKS2	<i>Discodermia dissoluta</i> (sponge)	I
Hemiasterlin (HTI-286)	NRPS1	<i>Cymbastella</i> sp. (sponge)	I
Bengamide derivative (LAF389)	Mixed PSK/NRPS	<i>Jaspis</i> sp. (sponge)	I
Agelasphin derivative (KRN-7000)	Glycosphing olipid	<i>Agelas mauritanus</i> (sponge)	I
Laulimalide	PKS2	<i>Cacospongia mycofijiensis</i> (sponge)	preclinical
Sarcodictyin	Terpene	<i>Sarcodictyon roseum</i> (sponge)	preclinical
Peloruside A	PKS2	<i>Mycale hentscheli</i> (sponge)	preclinical
Salicylhalimides A	PKS2	<i>Haliclona</i> sp. (sponge)	preclinical
Thiocoraline	NRPS1	<i>Micromonospora marina</i> (bacteria)	preclinical

NRPS= nonribosomal peptide synthase ; PKS =polyketide synthase

เป็นที่สังเกตว่าสมัยเมื่อประมาณ 30 ปีที่แล้ว ไม่ค่อยมีใครสนใจแอกติโนมัยซีทที่พบในระบบนิเวศทางทะเลกัน เนื่องจากมีความคิดว่า ทะเลไม่น่าจะเป็นแหล่งที่จะพบได้ ประมาณช่วง 2 ทศวรรษที่ผ่านมา รายละเอียดด้านความหลากหลายของแอกติโนมัยซีทในระบบนิเวศทางทะเลเริ่มมีมากขึ้น และเริ่มมีผู้สนใจอย่างต่อเนื่องและยาวนาน อันเนื่องมาจากคุณสมบัติด้านความสามารถในการสร้างสารยับยั้งจุลินทรีย์และสารออกฤทธิ์อื่น ๆ ที่ใช้ทางการแพทย์ ที่โดดเด่น แต่อย่างไรก็ตามก็ยังคงเป็นที่ถกเถียงกันว่า การแพร่กระจายและธรรมชาติของแอกติโนมัยซีทในระบบนิเวศทางทะเลนั้น แท้ที่จริงแล้วแอกติโนมัยซีทเป็นแบคทีเรียที่อาศัยอยู่ดั้งเดิมในทะเล หรือว่าเป็นเพียงแบคทีเรียที่ถูกชะมาจากบนบกชายฝั่ง ทำให้เรามักจะเรียกว่าแอกติโนมัยซีทในสิ่งแวดล้อมทางทะเลมากกว่าที่จะเรียกว่าแอกติโนมัยซีททะเล

บริเวณชายฝั่งอาณาเขตที่เป็นท้องทะเล เป็นบริเวณระบบนิเวศที่เชื่อมต่อกับผิวน้ำรวมทั้งเชื่อมต่อกับแนวป่าชายเลนจึงเป็นอีกบริเวณหนึ่งที่นักวิจัยนิยมค้นหาแอกติโนมัยซีทชนิดใหม่ ๆ ที่มีคุณสมบัติในการสร้างสารออกฤทธิ์ชีวภาพต่าง ๆ เนื่องจากการค้นหาสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพหรือสารปฏิชีวนะจากแอกติโนมัยซีทที่แยกจากดินทั่วไป มักจะพบสารชนิดที่เคยพบแล้วเป็นส่วนมาก และจากรายงานของ Kelman และคณะ (Kelman et al., 2005) พบว่า แอกติโนมัยซีทในสิ่งแวดล้อมทางทะเลมีการสร้างสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพที่มีความหลากหลายมากกว่าที่พบจากบริเวณแหล่งอื่น ดังนั้นนักวิจัยส่วนใหญ่จึงมองหาบริเวณระบบนิเวศทางทะเลอื่น ๆ ที่นอกเหนือจากแหล่งเดิม ๆ บนบก เช่น ชายฝั่งทะเลหรือในทะเลซึ่งมีพื้นที่ถึง 3 ใน 4 ของพื้นที่โลกเป็นแหล่งค้นหาแอกติโนมัยซีทชนิดใหม่ ๆ และค้นหารายสารใหม่ ๆ จากแอกติโนมัยซีทเหล่านี้ (Das, et al., 2008; Ismet, et al., 2004; Jensen, et al., 1991; Solanki, et al., 2008) เนื่องจากในสิ่งแวดล้อมที่เป็นทะเลก็มีหลายรายงานวิจัยทั้งในอดีตเรื่อยมาจนถึงทุกวันนี้ และเรายังสามารถพบแบคทีเรียในกลุ่มแอกติโนมัยซีทได้หลากหลายชนิดเช่นกัน (Weyland, 1986; Maldonado, et al., 2005; Bull, et al., 2005; Bredholt, et al. 2007; Anzai, et al., 2008; Solano, et al., 2009; Hong, et al., 2009; Prieto-Davo, et al., 2013) โดยเฉพาะที่สามารถเพาะเลี้ยงให้เจริญบนจานเพาะเชื้อได้มักอยู่ใน ชั้นคลาส *Actinobacteridae* โดยเฉพาะอย่างยิ่งแอกติโนมัยซีทที่อยู่ในออร์เดอร์ *Actinomycetales* ซึ่งเป็นเป้าหมายในการค้นหาสารทุติยภูมิใหม่ ๆ ที่ออกฤทธิ์ต่อไป (Kumar, et al., 2011, Zotchev, 2012)

ในงานวิจัยนี้ ได้มีการเก็บตัวอย่างเพิ่มเติมจากดินตะกอนจากระบบนิเวศป่าชายเลน ซึ่งเป็นบริเวณที่เชื่อมต่อกับทะเล และน้ำทะเลท่วมถึง มีน้ำขึ้นและน้ำลงวันละ 2 ครั้ง รวมทั้งจากที่อยู่กับฟองน้ำทะเล ควบคู่ไปกับการพัฒนาการผลิตเซลล์เพื่อให้ได้แอกติโนมัยซีทที่มากเพียงพอต่องานวิจัย ในโครงการที่ 3 และโครงการที่ 4 ของแผนงานวิจัย ส่วนยีสต์ได้ใช้ยีสต์ที่แยกจากน้ำทะเลชายฝั่งที่มีอยู่แล้ว จากห้องปฏิบัติการจุลชีววิทยา สถาบันวิทยาศาสตร์ทางทะเล ในการศึกษาการเลี้ยงในปริมาณมาก

### บทที่ 3 อุปกรณ์ และวิธีการวิจัย

วิธีการดำเนินการวิจัย และสถานที่ทำการทดลอง/เก็บข้อมูล

สถานที่ในการดำเนินการวิจัย /เก็บข้อมูล : สถาบันวิทยาศาสตร์ทางทะเล มหาวิทยาลัยบูรพา

สถานที่เก็บตัวอย่างเพื่อแยกเชื้อแอดดีโนมายซีท : ป่าชายเลนภาคตะวันออก/ อ่าวไทยตอนกลางคือ

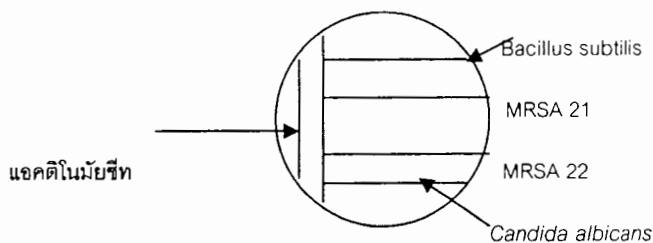
จังหวัด นครศรีธรรมราช

วิธีดำเนินการวิจัย มีขั้นตอนดังต่อไปนี้

3.1 การแยกเชื้อและการทดสอบฤทธิ์สารแอนติไบโอติกจากเซลล์แอดดีโนมายซีทที่ได้จากฟองน้ำและ/หรือจากตะกอนทะเล (ตัวอย่างฟองน้ำ ได้จากการเก็บตัวอย่างจากแผนโครงการ)

3.1.1 แยกเชื้อจากฟองน้ำทะเล และ/หรือ ตะกอนชายฝั่ง โดยใช้ selective medium 3 ชนิด Actinomycete Isolation Agar(Difco), ISP2 ( International Streptomyces Project 2) และ Starch Casein Agar แยกเชื้อให้บริสุทธิ์แล้วนำมาทดสอบฤทธิ์ยับยั้งจุลินทรีย์ (Methicillin Resistant *Staphylococcus aureus*(Hospital strains), *Candida albicans* TISTR 5239) ก่อนนำมาเลี้ยงให้เจริญและสร้างสปอร์บนจานเพาะเชื้อ ในอาหาร ISP 2 (ที่มีน้ำทะเล 50%) บ่มที่อุณหภูมิ 30 °C เป็นเวลา 4-7 วัน

3.1.2 ตรวจสอบความสามารถในการสร้างสาร แอนติไบโอติกยับยั้ง MRSA และ/ หรือ *Candida albicans* ด้วยวิธี Cross streak โดยเลี้ยงเชื้อแอดดีโนมายซีททุกไอโซเลตที่แยกได้ใหม่ลงบนจานอาหาร ISP2 ที่ด้านใดด้านหนึ่งของจาน แล้วบ่มเชื้อให้เจริญ ที่อุณหภูมิ 30 °C เป็นเวลา 5-7 วัน แล้วนำเชื้อทดสอบ ( *Bacillus subtilis*, MRSA 21, MRSA22 และ *Candida albicans* ) ที่เลี้ยงให้เจริญในอาหารเหลว อายุ 18-24 ชม ที่มีความขุ่น ที่เทียบได้กับสารละลาย McFarland หมายเลข 0.5 มา streak ที่ด้านขวามือ ให้ตั้งได้ฉากกับแนวการเจริญของเชื้อ แล้วบ่มเชื้อต่อไปที่อุณหภูมิเดิมอีก 24 ชั่วโมง เพื่อตรวจดู Clear zone ที่เกิดขึ้น (ที่ห่างจากแนวการเจริญของแอดดีโนมายซีท)



ภาพที่ 1 การทดสอบเบื้องต้น ด้วยวิธี Cross streak technique ตรวจสอบการสร้างสารออกฤทธิ์ยับยั้งจุลินทรีย์

3.1.3 ตรวจสอบลักษณะรูปร่างทางสัณฐานวิทยาของเชื้อ สายไซสเปอร์ เพื่อตรวจสอบลักษณะรูปร่างเชื้อ และเก็บรักษาเชื้อไว้ โดยนำแอคติโนมัยซีททุกไอโซเลตที่แยกได้มา เลี้ยงให้เจริญบนจานเพาะเชื้อ ที่ 30 °C เป็นเวลา 4-7 วัน แล้วตรวจสอบลักษณะทางสัณฐานวิทยาภายใต้กล้องจุลทรรศน์ และกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอน (Scanning Electron Microscope)

3.1.4 เลี้ยงแอคติโนมัยซีทที่สร้างสารออกฤทธิ์ /หรือสร้างสารรงควัตถุ ได้มาก ในอาหารชนิดต่าง ๆ กันเพื่อศึกษาความเหมาะสมของอาหารในการเจริญ หรือเลี้ยงเพื่อให้ผลิตสารออกฤทธิ์ หรือสารรงควัตถุให้ได้มากขึ้น โดยเลี้ยงในอาหารทั้งหมด 7 ชนิดคือ อาหาร Glucose -Yeast Extract, ISP2, ISP3 (Oat meal agar), ISP4 (Inorganic Salt Starch), ISP5 (Glycerol-Asparagine), ISP7 (Tyrosine Agar) และ ISP8

3.1.5 เลี้ยงเชื้อชนิดที่สนใจที่สร้างสารออกฤทธิ์ /หรือสร้างสารรงควัตถุ ได้มาก มาเลี้ยงในอาหารเหลวที่พบที่เหมาะสมที่สุด (ISP2) โดยเติมน้ำทะเล 25-30% ปั่นในตู้ Shaker ที่ 30 °C และเขย่า ที่ 110 rpm เป็นเวลา 7-10 วัน แล้วเก็บเซลล์ด้วยวิธีปั่นเหวี่ยง ล้างด้วย Normal saline ก่อนนำเซลล์ไป freeze dry เพื่อ ตรวจวิเคราะห์ชนิดกรดไขมันในโครงการที่ 4

3.1.6 เลี้ยงเชื้อที่ให้สารออกฤทธิ์ หรือให้สารสีที่ดีในบางชนิด เพื่อสกัด DNA เพื่อวิเคราะห์หาลำดับเบส ด้วย Test Kit(ภาคผนวก

หมายเหตุ: Starch Casein Agar ประกอบด้วย Soluble Starch 10.0 g, Casein 1.0 g,  $K_2HPO_4$  0.5 g, Agar 15.0 g และ Trace salt solution 1 ml ต่ออาหาร 1 ลิตร

ISP2 ประกอบด้วย Yeast Extract 4.0 g, Malt Extract 10.0 g Glucose 4.0 g น้ำกลั่น 1000 ml และ Agar 15.g

ISP3 ประกอบด้วย ข้าวโอ๊ต 20 g, Trace salt solution 1 ml(  $FeSO_4 \cdot 7 H_2O$  0.1 g,  $MnCl_2 \cdot 4H_2O$  0.1 g,  $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$  0.1 g), Agar 15 g น้ำกลั่น 1000 ml

ISP4 ประกอบด้วย Soluble starch 10 g,  $K_2HPO_4$  1 g,  $MgSO_4$  1g, NaCl 1 g,  $(NH_4)_2SO_4$  2 g,  $CaCO_3$  2 g, trace salt solution 1 ml, Agar 20 g, น้ำกลั่น 1000 ml

ISP5 ประกอบด้วย Glycerol 10 g, L-Asparagine 1 g,  $K_2HPO_4$  1 g, Trace salt solution 1 ml (เหมือน ISP3) Agar 15 g, น้ำกลั่น 1000 ml pH 7.0-7.4

ISP7 (Tyrosine agar), L-Asparagine 1 g, L-Tyrosine 0.5 g,  $K_2HPO_4$  0.5 g,  $MgSO_4$  0.5 g, NaCl 0.5 g, Trace salt solution 1 ml, Agar 20 g, น้ำกลั่น 1000 ml

ISP8 ประกอบด้วย Beef extract 3 g, Peptone 5 g,  $KNO_3$  1 g, Agar 15-20 g น้ำกลั่น 1000 ml, pH 7.0

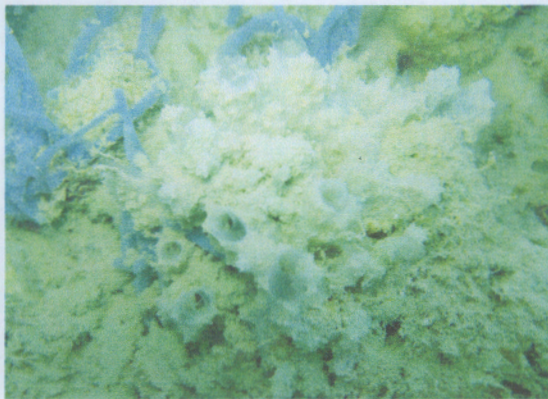
3.2 ยีสต์ โดยใช้ ยีสต์ BS 6-1 และ BS 6-2 ที่แยกได้จากทะเล มาทดสอบการเจริญในอาหารสังเคราะห์และอาหารธรรมชาติ (กากชานอ้อย) โดยเลี้ยงและสังเกตการเจริญในอาหาร YM และกากชานอ้อย

#### บทที่ 4 ผลการวิจัย

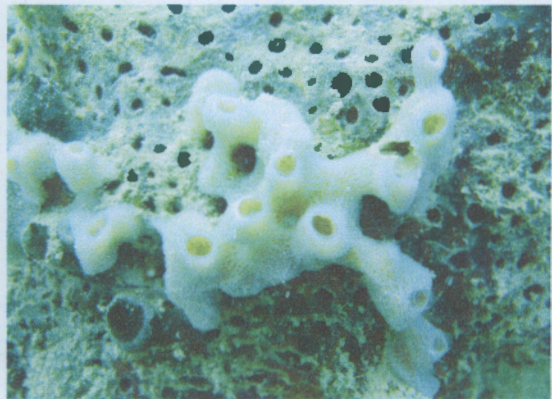
จากการที่ได้เก็บตัวอย่างเพื่อแยกเชื้อแอคติโนมัยซีทเพิ่มเติม เพื่อใช้สำหรับโครงการวิจัยที่ 3 และโครงการที่ 4 ของแผนการวิจัยที่เกาะراب เกาะวังนอก และป่าชายเลน ในอำเภอขนอม จังหวัดนครศรีธรรมราช ได้ผลดังนี้

##### A แยกเชื้อแอคติโนมัยซีท จากฟองน้ำทะเล และ จาก ตะกอนป่าชายเลน อ. ขนอม จ. นครศรีธรรมราช

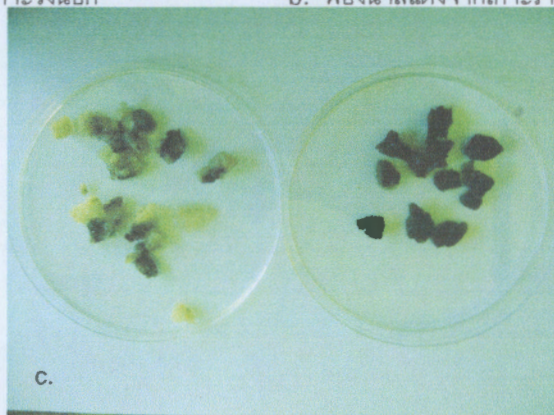
1. ได้ทำการแยกเชื้อแอคติโนมัยซีทจากฟองน้ำทะเลและจากตะกอนป่าชายเลนชายฝั่งของ อ. ขนอม จังหวัดนครศรีธรรมราช โดยเก็บฟองน้ำจากเกาะراب 23 ตัวอย่าง เกาะวังนอก 16 ตัวอย่าง และจากป่าชายเลน อ. ขนอม 7 ตัวอย่าง มาแยกเชื้อบนอาหาร 3 ชนิดคือ ISP2, SCA และ Actinomycete Isolation Agar พบ แอคติโนมัยซีทจากฟองน้ำเกาะراب 2 ไอโซเลต จากเกาะวังนอกพบ 2 ไอโซเลต และป่าชายเลนพบแอคติโนมัยซีท 52 ไอโซเลต จากนั้นทำเชื้อให้บริสุทธิ์ และ เก็บรักษาเชื้อทั้งใน อาหารรูนเฉียง (slant culture) และที่  $-40^{\circ}\text{C}$  ฟองน้ำจากเกาะرابที่พบแอคติโนมัยซีท คือฟองน้ำครกทอสีม่วง และฟองน้ำสีแดง ส่วนฟองน้ำจากเกาะวังนอกที่พบแอคติโนมัยซีท คือฟองน้ำกิ่งสีม่วง และฟองน้ำหนามสีเทา นอกจากนี้ยังพบราทะเลด้วยอีก 1 ชนิดจากฟองน้ำสีแดงของเกาะراب



a. ฟองน้ำครกทอสีม่วง จากเกาะวังนอก



b. ฟองน้ำสีแดงจากเกาะراب

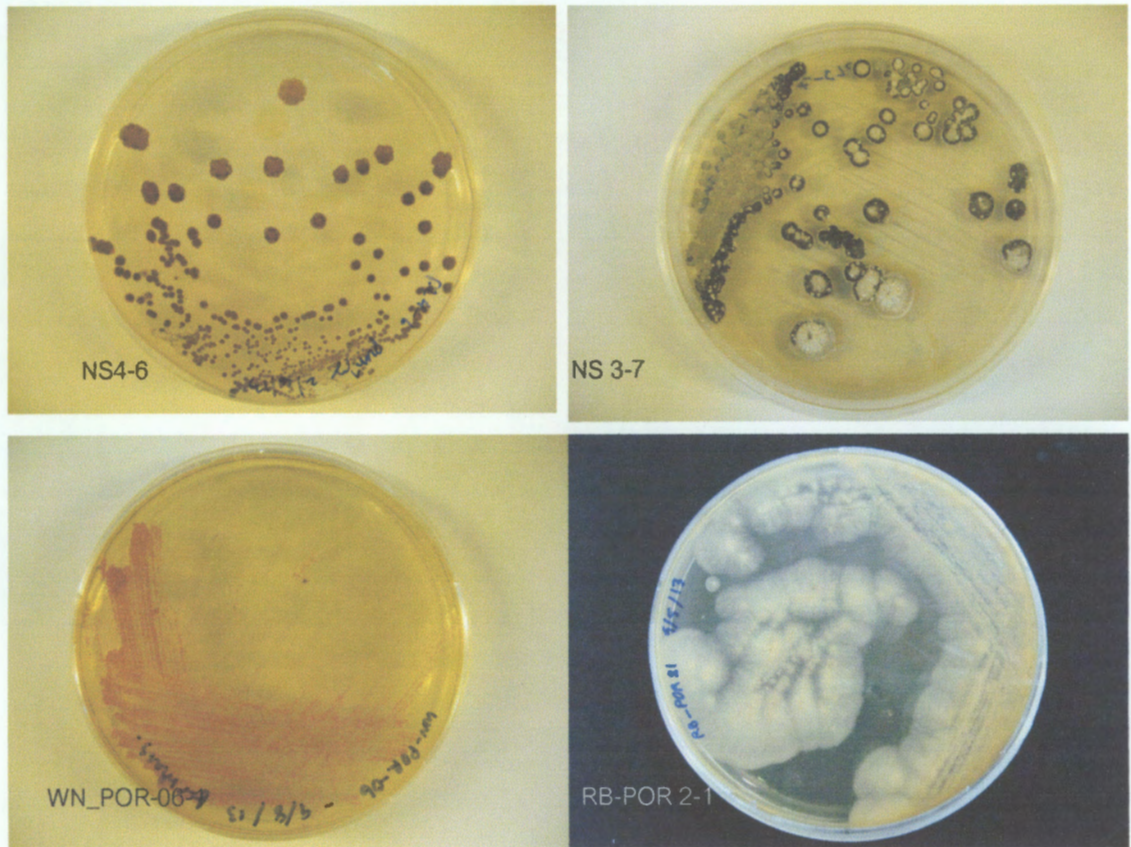


c.

ภาพที่ 2: a และ b ฟองน้ำที่นำมาแยกเชื้อ c. ฟองน้ำที่ถูกตัดเป็นชิ้นเล็ก ๆ ก่อนนำมาแยกเชื้อ

## 2. ศึกษาการสร้างสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพ ของเชื้อที่แยกได้

เชื้อแอกติโนมัยซีททุกไอโซเลตที่พบ ทุกชนิด รวมทั้งเชื้อรา จะนำมาทดสอบการออกฤทธิ์ยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์ เช่น MRSA, *B. subtilis*, *C. albicans* ด้วยการเลี้ยงเชื้อแอกติโนมัยซีทให้เจริญเติบโตบนอาหาร ISP2 เป็นเวลา 5-7 วัน ที่ 30°C ก่อนการทดสอบด้วยวิธี cross streak technique ให้ผลดังตารางที่ 2



ภาพที่ 3 แอกติโนมัยซีทบนจานเพาะเชื้อ จากป่าชายเลนนครศรีธรรมราช เกาะวังนอก และเกาะرابใต้เชื้อรา

(RB-POR2-1)

ตารางที่ 2 แอกติโนมัยซีทที่ได้แยกเชื้อเพิ่มเติมจากป่าชายเลน ในจังหวัดนครศรีธรรมราช และฤทธิ์ชีวภาพยับยั้งจุลินทรีย์ที่สร้างได้

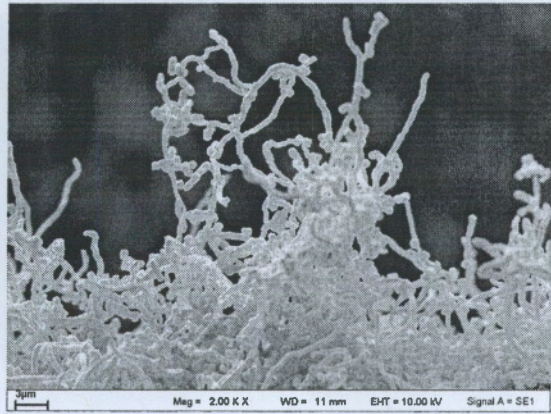
Isolate ID	Aerial hyphae	Substrate hyphae	Color of Spore mass	Color of Substrate	Spore chain type	Cell wall DAP	Sugar Pattern	Antibiosis to (diameter of zone, cm)				Identified
								<i>B. subtilis</i>	MRSA 21	MRSA 22	<i>C. albicans</i>	
NS1-1								-	-	-	-	
NS1-2	+	+	C	RO				1.5	0.5	-	-	
NS1-3								-	-	-	-	
NS1-4	+	+	G	O				2.6	2.2	2.2	1.5	
NS1-5	+	+	W	Bn				1.2	-	-	-	
NS1-6	+	+	G	Bn				-	-	-	-	
NS1-7								-	-	-	-	
NS1-8								-	-	-	-	
NS1-9	+	+	G	Y				2.0	-	-	-	
NS2-1								-	-	-	-	
NS2-2	+	+	W	Bn				-	0.5	0.3		
NS2-3	+	+	G	Bn				-	0.5	0.3	-	
NS2-4								-	-	-	-	
NS2-5	+	+	G	Bn				0.5	0.5	0.5	-	
NS3-1	+	+	W	DY	S		Gal	2.0	-	2.0	-	<i>Streptomyces</i>
NS3-2	+	+	W	Y	S		Gal	2.2	-	1.6	-	<i>Streptomyces</i>
NS3-3	+	+	W	YBn	S		-	3.0	-	-	0.5	<i>Streptomyces</i>
NS3-4								-	-	-	-	
NS3-5	+	+	BkBn	YBn				-	-	-	2.8	
NS3-6						Meso-DAP	Gal	-	-	-	-	
NS3-7	+	+	G	YBn				-	-	-	0.2	
NS3-8	+	+	W	P				-	-	2.0	-	
NS3-9	+	+	W	C				1.5	-	-	-	
NS3-10	+	+	W	PY			Gal, Ara	-	-	2.2	-	
NS3-11								-	-	-	-	
NS3-12								-	-	-	-	
NS4-1	+	+	Bn	LY				-	-	-	2.8	

Isolate ID	Aerial hyphae	Substrate hyphae	Color of Spore mass	Color of Substrate	Spore chain type	Cell wall DAP	Sugar Pattern	Antibiosis to				Identified
								<i>B. subtilis</i>	MRSA 21	MRSA 22	<i>C. albicans</i>	
NS4-2	+	+	WP	C			Gal	1.0	-	-	-	
NS4-3	+	+	DBn	DBn	h, R	LL-DAP	-	-	-	-	-	<i>Streptomyces</i>
NS4-4	+	+	G	WG			Gal, Man	1.5	-	-	1.2	
NS4-5								-	-	-	-	
NS4-6	+	+	W->G	LBn	R,h,l	-	-	2.0	1.5	1.0	0.2	<i>Streptomyces</i>
NS4-7	+	+	WG	Y				-	-	-	-	
NS4-8								-	-	-	-	
NS4-9								-	-	-	-	
NS4-10	-	+	W	W				3.5	2.0	-	-	
NS4-11								-	-	-	-	
NS4-12	-	+						2.5	2.5	1.0	-	
NS4-13								-	-	-	-	
NS4-14	+	+	G	Bn	R, h	-		-	1.0	1.0	1.0	<i>Streptomyces</i>
NS5-1	+	+	GBn					-	-	-	-	
NS5-2								-	-	-	-	
NS5-3	+	+	W	PkO	R, h			1.9	1.5	-	-	<i>Streptomyces</i>
NS5-4	+	+	WBn	Bn	S		Gal	3.2	2.0	-	-	
NS5-5								-	-	-	-	
NS5-6								-	-	-	-	
NS5-7								-	-	-	-	
NS6-1	+	+	W	Bn				1.0	1.0	1.0	-	
NS6-2	+	+	LG	YBn	R, S		-	-	-	-	0.3	<i>Streptomyces</i>
NS7-1								-	-	-	-	
NS7-2								-	-	-	-	
NS7-3	+	+	W->G	WY	R,h	-	-	1.0	1.5	1.5	0.5	<i>Streptomyces</i>
NS7-4								-	-	-	-	
NS7-5								-	-	-	-	
WN-POR06-1	-	+	O->Bk		single	Meso-DAP	Ara, Xyl					<i>Micromonospora</i>

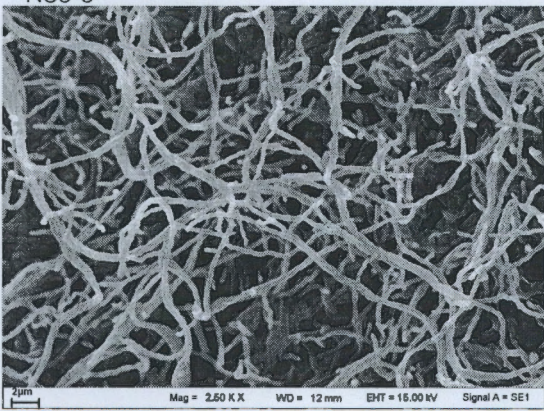
3. ผลการตรวจดูลักษณะรูปร่างทางสัณฐานวิทยาของเชื้อแอกติโนมัยซีท ซึ่งตรวจดูภายใต้กล้องจุลทรรศน์ (light microscope) ในเบื้องต้น และเตรียมตัวอย่าง โดยเลี้ยงให้เจริญบนจานอาหาร ISP2 ที่ 30 °C เป็นเวลา 5-7 วันก่อน fix ด้วย gluteraldehyde เป็นเวลา 1 คืน(ห่อด้วยอลูมิเนียมฟอยล์เพื่อไม่ให้ถูกแสง) แล้ว dehydrate น้ำออกด้วยอัลกอฮอล์เปอร์เซ็นต์ต่าง ๆ (30%, 50%, 70%, 85%, 95% และ absolute ethanol ) ทำให้แห้งด้วยวิธี freeze dry หรือ CPD ก่อนเคลือบด้วยทอง แล้วตรวจดูด้วยกล้อง Scanning electron microscope



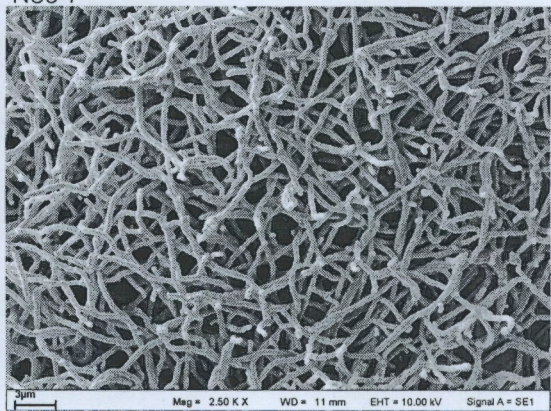
NS3-3



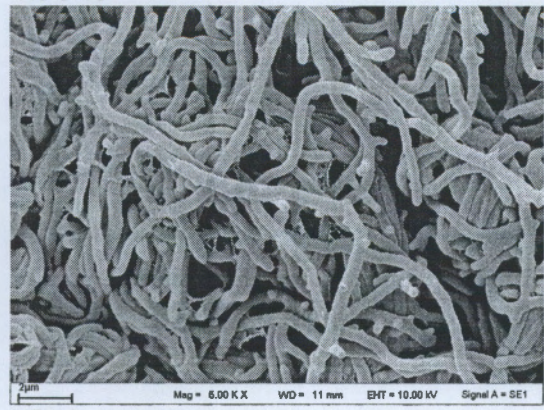
NS3-7



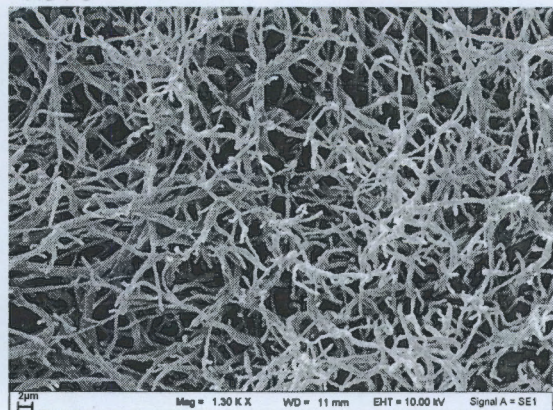
NS3-10



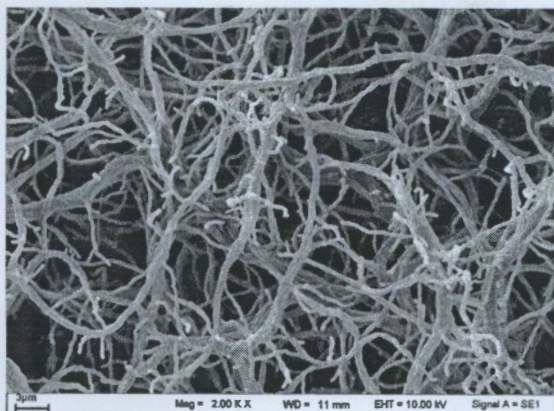
NS4-3



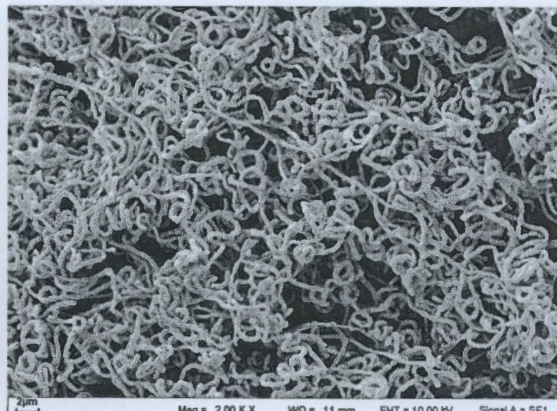
NS4-6



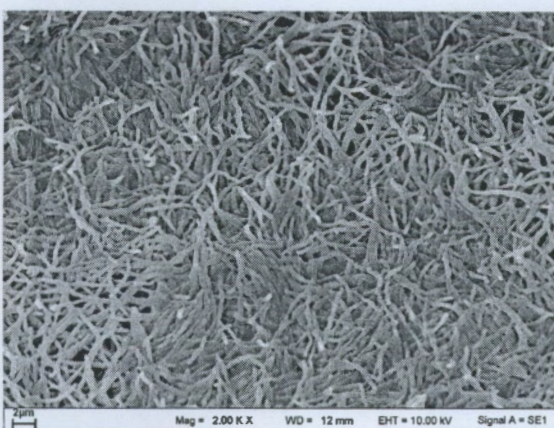
NS4-14



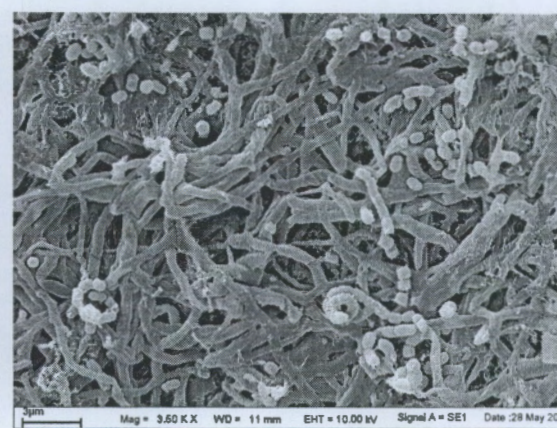
NS 5-3



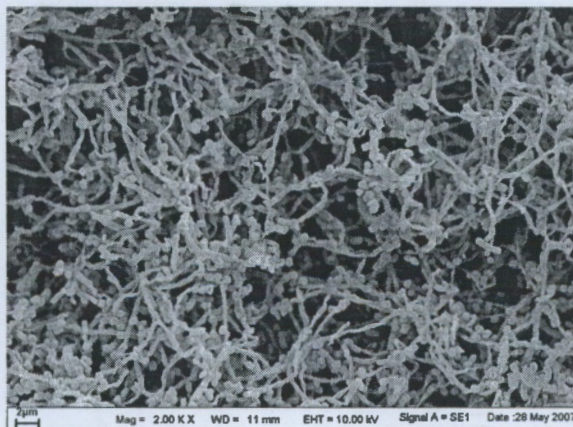
NS6-2



A16-1



A1-3



A3-3



CH54-5

ภาพที่ 4 ภาพจาก ภายใต้อกล้อง Scanning Electron Microscope ของ *Streptomyces* A1-3, A 3-3 (ที่ผ่านการเหนียวนาให้กลายเป็นผงด้วยแสง UV แล้ว), *Streptomyces* CH54-5, PL3-3, PL3-7, NS3-10, NS4-3, NS4-6, , NS6-2, NS4-14, A16-1, A1-3 และ A3-3

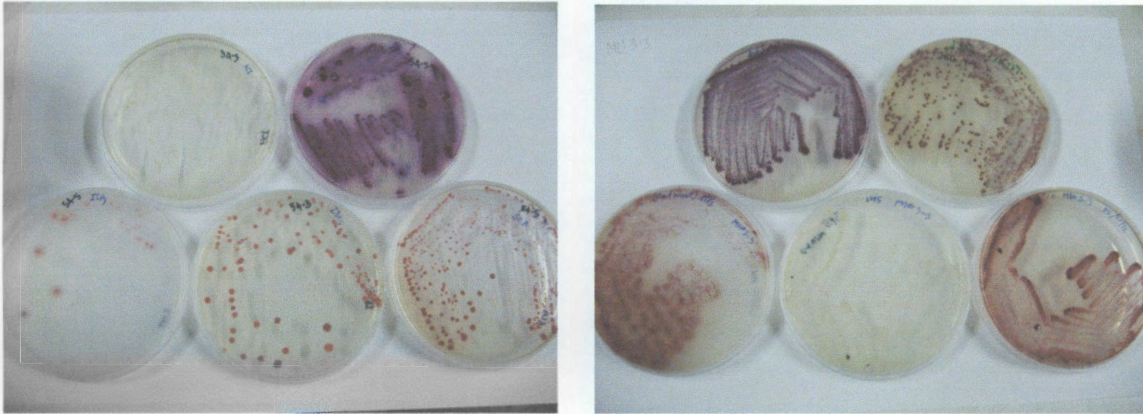
4. ผลของการศึกษาความเหมาะสมของอาหารชนิดต่าง ๆ ต่อการเจริญ / สารรงควัตถุ ของแอสติโนมัยซีท โดยคัดเลือกจากแอสติโนมัยซีทที่มีอัตราการเจริญเติบโตใกล้เคียงกันมาเลี้ยงในอาหาร Glucose-Yeast, ISP2, ISP3 (Oat meal agar), ISP4 (Inorganic Salt Starch), ISP5 (Glycerol-Asparagine), ISP7 (Tyrosine Agar) และ ISP8 ได้ผลดังตารางที่ 3

ตารางที่ 3 ผลการทดสอบการเจริญ และสีของรงควัตถุที่เปลี่ยนไป บนอาหารชนิดต่าง ๆ

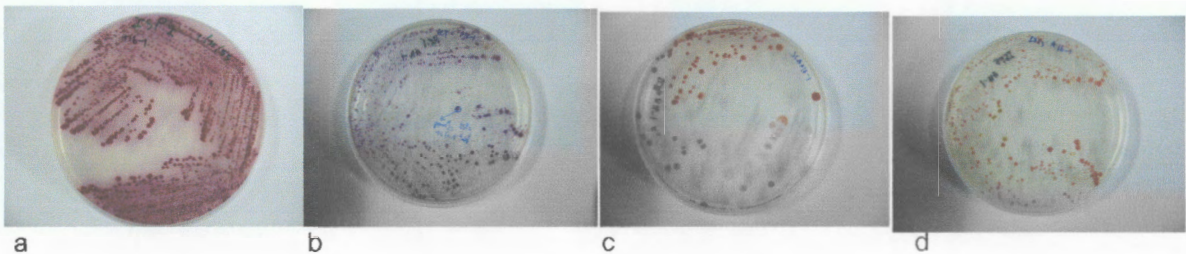
Isolate ID	Glucose-Yeast extract	ISP2	ISP3 (Oatmeal)	ISP4	ISP5	ISP7 (Tyrosine)	ISP8
A16-1	+++ P/P	++++ P/R	++ W/W	++ CW/C	++C/P	++ W/P	++++ G/PBn
CH54-8	++ CW/LY	++++Bn/BnY	+++ WP/WP	+ C/C	++ C/C	+++ BnR/BnR	++ W/LY
NS2-2	++++ LBn/Bn	++++W/BnY	++++ Gn/LBn	++I- C/C	+++Bn/Bn	++++ Bn/DBn	++++Bn D ring/ same
NS2-3	++++ W/BnY	+++ W/LY	+++ LG/LG	+ C/C	++ W/LG	+++ G/ LG	++ WW
NS2-5	++++ W/BnY	++++ GBn/BnY	+++ CBn/CBn	+ C/C	++ W/LG	+++ W/ LG	+++ WW
NS3-1	++++ LY/LY	+++ C/ LBnY	+ C (no aerial)	NA	++ WC/WC	+++ CY/CY	++++ LY/LY
NS3-2	++++ W/BnY	++++ W/ WY	+ C (no aerial)	NA	++ WC	+++ CY/CY	++++ WLY/LY
NS4-2	+++ LBn/Bn	+++ Bn/ BnY	++ Bn/.Bn	+ C/C	+ C/C	+++ BnP/BnP	+++ Bn/Bn
NS4-4	NA	++++ Bn/BnY	NA	NA	NA	NA	NA
NS4-6	++++ LBn/ LBnY	NA	+ C/C	+ C	+++ CLBn	+++ PBn/PBn	+++ Bn/Bn
NS5-1	++++YLbn/same	+ C/C	+++ WC/C	+ C	+ C	NA	++++ LBn/LBn
NS5-3	+++ W/Y	+ W/C	++ WW	NA	+ W/W	++ W/W	++++ W/LY
NS5-4	NA	++++ W/LBn	NA	NA	NA	NA	NA
NS6-2	++++ W/Y	+++ WC/C	+++ C no aerial	NA	+++ C	+++ LY	++++ CLBn
NS7-3	++++W/Y	++++W/Y	+++ w/C	NA	+++ C	+++ LY/LY	++++ LY/LY
NS3-10	++++ W/BnY	++++ W/WY	+++ WC	NA	++ W/WC	NA	++++ LBn/LBn
NS4-14	+++ C	+++ C	NA	NA	NA	NA	++++ W->LY/LY
WN-POR-06-1	++ Bn no aerial	++++ OBk	+++ BnY	NA	++ LBn	+++ OLBn	++++ O->Bk

หมายเหตุ: + ไม่ค่อยเจริญ ++ เจริญไม่ดี +++ เจริญปานปานกลาง ++++ เจริญดี และดีมาก

Bk=black, Bn= brown, C= cream, CY= cream yellow, G= gray, LG= light gray, LBn= light brown, W= white, WC= whitish cream, LBn= light brown, O=orange, P=pink, Y=yellow, NA= not applicable



ภาพที่ 5 การเจริญและการสร้างสารรงควัตถุ บนอาหารชนิดต่าง ๆ (ISP2, ISP3, ISP4, ISP5, Starch Casein) ของ แอคติโนมัยซีท A1-3 และ A3-3



ภาพที่ 6 การเจริญและการสร้างสารรงควัตถุ บนอาหารชนิดต่าง ๆ ของ แอคติโนมัยซีท A16-1, a บน ISP2, b บน Actinomycete Isolation Agar, c บน Starch Casein Agar, d บน ISP5

- ผลของการศึกษาความเหมาะสมของ pH ที่มีต่อการสร้างสารออกฤทธิ์ ยับยั้งจุลินทรีย์ จากที่ได้คัดเลือกเชื้อที่สร้างสารออกฤทธิ์/ รงควัตถุ ที่ดี มาทดสอบฤทธิ์ยับยั้งจุลินทรีย์ MRSA 21, MRSA 22, MRSA 39 และ *C. albicans* ที่ pH 7, pH 7.5, pH 8.0 และ pH 9.0 ได้ผลดังตารางที่ 4

ตารางที่ 4 ผลการศึกษาการสังเคราะห์สารออกฤทธิ์ยับยั้งจุลินทรีย์ของแอสดีโนไมซีที่สังเคราะห์จากฤทธิ์ที่ดี ในอาหารที่มี ค่า pH ต่าง ๆ กัน โดยทดสอบฤทธิ์ยับยั้งเชื้อ MRSA และ *Candida albicans*

Isolate	MRSA 21				MRSA 22				MRSA 39				<i>C. albicans</i>			
	pH 7	pH7.5	pH8.0	pH9.0	pH 7	pH7.5	pH8.0	pH9.0	pH 7	pH7.5	pH8.0	pH9.0	pH 7	pH7.5	pH8.0	pH9.0
NS 5-3	1.1	1.5	1.6	1.3	1.6	1.8	2.0	1.7	1.2	2.0	2.0	1.6	0	0	0	0
A16-1	1.0	1.2	0.6	1.0	1.0	0.9	0.4	0.8	1.2	1.2	0.3	0.3	0	0	0	0
NS 1-4	1.1	1.3	1.4	0.8	1.0	1.5	1.4	0.5	1.2	1.5	1.35	0.95	0	0	0	0
NS 2-3	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
NS 4-6	2.3	2.6	3.0	2.4	2.8	2.75	2.8	2.25	3.9	2.95	3.4	2.95	1.2	0	0	0
NS 6-2	1.15	2.0	2.0	1.85	1.2	2.3	2.3	2.05	1.6	1.7	1.6	1.2	0	0	0	0
NS 4-1	1.0	1.2	1.6	1.6	1.1	1.4	1.8	1.8	1.4	1.7	1.8	2.0	0.4	1.2	0.7	0.5

หมายเหตุ โดยวัดจากระยะของ clear zone เป็นเส้นตรง

6. เลี้ยงเชื้อปริมาณมาก ส่งต่อไปกับโครงการ ที่ 3 และที่ 4 เพื่อสกัดสารทดสอบฤทธิ์ชีวภาพอื่น ๆ (antioxidant) และวิเคราะห์กรดไขมัน (ตารางที่ 5)

แอดดิโนมายซีทที่ถูกคัดเลือกเพื่อผลิตเซลล์ปริมาณมากเพื่อส่งต่อโครงการที่ 4 และที่ 3 โดยจะนำมาเลี้ยงในอาหารเหลว ISP2 หรือ Glucose yeast extract เป็นเวลา 10-14 วัน ที่ 30 องศาเซลเซียส เขย่าเชื้อเพื่อให้อากาศที่ 110 rpm เก็บเซลล์ ด้วยวิธี centrifuge แยกเซลล์ และส่วนของอาหารเลี้ยงเชื้อออกจากกัน เพื่อวิเคราะห์ปริมาณกรดไขมัน และ สารแอนติออกซิแดนท์ โดยส่งเป็นเซลล์เปียก ซึ่งได้แก่แอดดิโนมายซีทต่อไปนี้ (ตารางที่ 5)

ตารางที่ 5 แอดดิโนมายซีทที่ได้คัดเลือกไว้และได้เลี้ยงเชื้อปริมาณมากเพื่อนำส่งโครงการที่ 3 และโครงการที่ 4 เพื่อการวิเคราะห์กรดไขมัน และสารแอนติออกซิแดนท์

Isolate ID	Fatty acid analysis	Antioxidant analysis	Crude extract(g wet wt/ medium (ml)
แอดดิโนมายซีท จากจันทบูร			
CH 54-5	Cell	Cell and medium	88.74/2,250
CH54-8		Cell and medium	75.55/1,500
แอดดิโนมายซีท จากชลบูร			
C15-1	Cell	Cell and medium	35.30/700
A16-1	Cell	Cell and medium	18.56/1,000
แอดดิโนมายซีท จาก นครศรีธรรมราช			
PL1-2	Cell	Cell and medium	14.22/500
PL2-2	Cell	Cell and medium	73.15/500
PL2-3	Cell	Cell and medium	5.56/500
PL2-5	Cell	Cell and medium	12.33/250
PL3-6	Cell	Cell and medium	17.91/250
PL3_7	Cell	Cell and medium	NA/250
PL3-10	Cell	Cell and medium	14.28/400
PL4-2	Cell	Cell and medium	12.78/250
PL4-4	Cell	Cell and medium	5.44/250
PL4-6	Cell	Cell and medium	67.5/2,250
PL4-10	Cell	Cell and medium	7.57/250
PL4-14	Cell	Cell and medium	41.64/1,000
PL5-1 (Glucose-Yeast extract)	Cell	Cell and medium	29.51/250
PL5-3	Cell	Cell and medium	6.54/250

Isolate ID	Fatty acid analysis	Antioxidant analysis	Crude extract(g wet wt/ medium (ml)
PL6-1	Cell	Cell and medium	1.95/250
PL6-2	Cell	Cell and medium	33.2/250
PL7-3	Cell	Cell and medium	16.19/250
PL7-4	Cell	Cell and medium	35.8/1,000
แอดคิโนมายซีที่แยกจากฟองน้ำ			
WN-POR -2-1 ACT	Cell	Cell and medium	27.82/250
WN-POR-06-1 SCA	Cell	Cell and medium	142.19/1,250
RB-POR-02-1	Cell	Cell and medium	49.53/1,250

## ยีสต์

### ศึกษาการเจริญของเซลล์ยีสต์

คัดเลือกยีสต์ สายพันธุ์ BS6-1 และ BS6-2 ซึ่งแยกได้จากชายฝั่งทะเล (บางแสน) เป็นต้นแบบในการเริ่มศึกษาการเลี้ยงเซลล์โดยนำมาเลี้ยงในอาหารที่แตกต่างกัน โดยเลี้ยงทั้งในอาหาร Synthetic (Yeast Malt Extract Medium, YM) และอาหารธรรมชาติ ซึ่งในระยะเริ่มต้นนี้คือกากขานอ้อย ซึ่งเป็นวัสดุเหลือทิ้ง

#### 1. การเจริญของเชื้อ BS 6-2 ในอาหารเลี้ยงเชื้อ YM

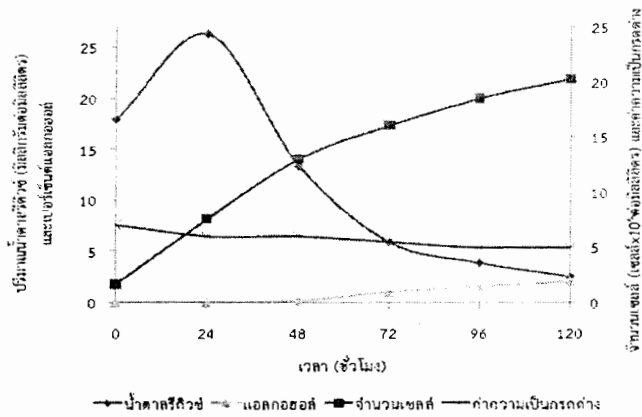


ภาพที่ 7 ภาพยีสต์ BS6-2 ภายใต้กล้อง

Inverted Microscope เซลล์มีลักษณะกลม/ รูปไข่

ขนาดใหญ่

จากการศึกษาการเจริญของเชื้อ BS 6-2 ในอาหารเลี้ยงเชื้อ YM โดยติดตามการเจริญเติบโตของเชื้อเป็นเวลา 120 ชั่วโมง และวัดปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ ปริมาณแอลกอฮอล์นับจำนวนเซลล์ พร้อมทั้งติดตามการเปลี่ยนแปลงของค่าความเป็นกรดต่าง ได้ผลดังแสดงในภาพที่ 8



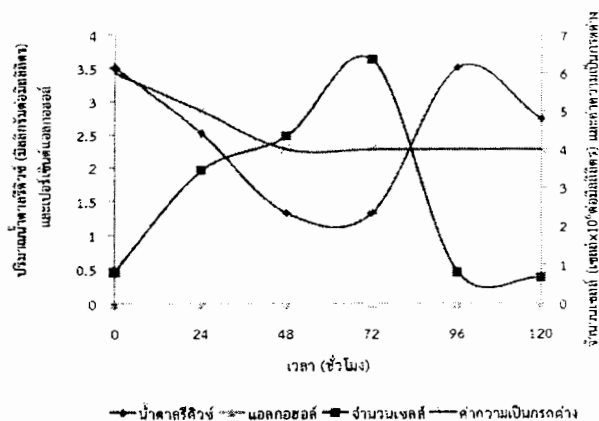
ภาพที่ 8 การเจริญของเชื้อ BS 6-2 ในอาหารเลี้ยงเชื้อ YM

จากการวัดปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ พบว่า ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์เริ่มลดลงตั้งแต่ชั่วโมงที่ 24 เป็นต้นไปเมื่อระยะเวลาการเลี้ยงเพิ่มขึ้น โดยลดลงสูงที่สุดชั่วโมงที่ 120 มีปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์เท่ากับ  $2.536 \pm 0.02$  มิลลิกรัมต่อมิลลิเมตร ในช่วงระยะเวลาที่น้ำตาลรีดิวซ์ลดลงนั้นเป็นระยะเวลาที่มีจำนวนเซลล์เริ่มเพิ่มขึ้น โดยจำนวนเซลล์เพิ่มขึ้นเรื่อยๆเมื่อระยะเวลาในการเลี้ยงเพิ่มขึ้น ซึ่งเพิ่มขึ้นสูงสุดชั่วโมงที่ 120 โดยมีจำนวนเซลล์เท่ากับ  $2.025 \times 10^7$  เซลล์ต่อมิลลิเมตร

สำหรับค่าความเป็นกรดค่าเริ่มลดลงตั้งแต่ชั่วโมงที่ 24 และยิ่งลดลงเมื่อระยะเวลาในการเลี้ยงเพิ่มขึ้น โดยค่าความเป็นกรดค่าลดลงต่ำสุดชั่วโมงที่ 96-120 ซึ่งมีค่าความเป็นกรดค่าที่ 5 ส่วนปริมาณแอลกอฮอล์นั้น พบว่ามีปริมาณสูงสุดชั่วโมงที่ 120 โดยมีปริมาณแอลกอฮอล์เท่ากับร้อยละ  $2.13 \pm 0.01$

2. การเจริญของเชื้อ BS 6-2 ในอาหารเลี้ยงเชื้อกากขานอ้อยใน SM30

จากการศึกษาการเจริญของเชื้อ BS 6-2 ในอาหารเลี้ยงเชื้อกากขานอ้อยใน SM30 โดยติดตามการเจริญเติบโตของเชื้อเป็นเวลา 120 ชั่วโมง และทำการวัดปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ ปริมาณแอลกอฮอล์ นับจำนวนเซลล์ พร้อมทั้งติดตามการเปลี่ยนแปลงของค่าความเป็นกรดค่า ได้ผลดังแสดงในภาพที่ 9



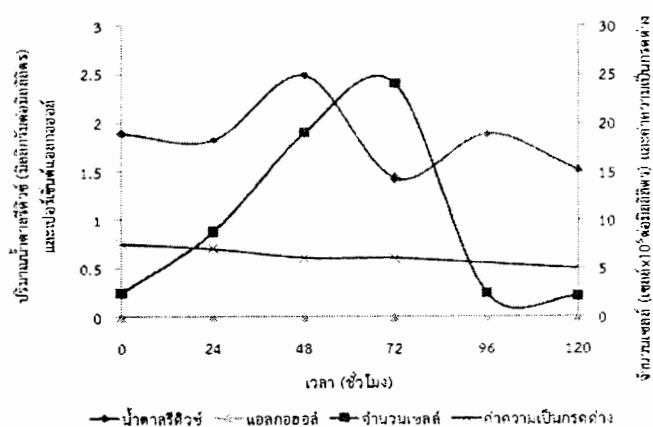
ภาพที่ 9 การเจริญของเชื้อ BS 6-2 ในอาหารเลี้ยงเชื้อกากขานอ้อยใน SM30

จากการวัดปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ พบว่าปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ลดลงเมื่อระยะเวลาในการเลี้ยงเพิ่มขึ้น โดยปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ลดลงสูงสุดชั่วโมงที่ 72 ซึ่งมีปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์เท่ากับ  $1.343 \pm 0.01$  มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ก่อนจะเริ่มเพิ่มขึ้นในระยะเวลาต่อมา โดยระยะเวลาที่ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ลดลงต่ำสุดนั้นเป็นระยะเวลาเดียวกันกับจำนวนเซลล์ที่เพิ่มขึ้นสูงสุด ซึ่งเพิ่มขึ้นถึง  $6.35 \times 10^6$  มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร หลังจากนั้นจำนวนเซลล์เริ่มลดลงเมื่อระยะเวลาในการเลี้ยงเพิ่มขึ้น

สำหรับค่าความเป็นกรดต่างเริ่มลดลงตั้งแต่ชั่วโมงที่ 24 และยิ่งลดลงเมื่อระยะเวลาในการเลี้ยงเพิ่มขึ้น โดยค่าความเป็นกรดต่างลดลงต่ำสุดชั่วโมงที่ 48-120 ซึ่งมีค่าความเป็นกรดต่างที่ 4 ส่วนปริมาณแอลกอฮอล์ของเชื้อ BS 6-2 ในอาหารเลี้ยงเชื้อกากขานอ้อยใน SM30 นั้นไม่พบปริมาณแอลกอฮอล์ตั้งแต่ชั่วโมงแรกถึงชั่วโมงที่ 120

3. การเจริญของเชื้อ BS 6-2 ในอาหารเลี้ยงเชื้อกากขานอ้อยใน SM30 ที่ทำการกรอกก่อนนำเข้าเครื่องหมักหนึ่งความดันอัตโนมัติ

จากการศึกษาการเจริญของเชื้อ BS 6-2 ในอาหารเลี้ยงเชื้อกากขานอ้อยใน SM30 ที่ทำการกรอกเอากากขานอ้อยออกก่อนนำเข้าเครื่องหมักหนึ่งความดันอัตโนมัติ โดยติดตามการเจริญเติบโตของเชื้อเป็นเวลา 120 ชั่วโมง และทำการวัดปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ ปริมาณแอลกอฮอล์ นับจำนวนเซลล์ พร้อมทั้งติดตามการเปลี่ยนแปลงของค่าความเป็นกรดต่าง ได้ผลดังแสดงในภาพที่ 10



ภาพที่ 10 การเจริญของเชื้อ BS 6-2 ในอาหารเลี้ยงเชื้อกากขานอ้อยใน SM30 ที่ทำการกรอกก่อนนำเข้าเครื่องหมักหนึ่งความดันอัตโนมัติ

จากแนววัดปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ พบว่า ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์เพิ่มขึ้นสูงสุดชั่วโมงที่ 18 โดยมีปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์เท่ากับ  $2.486 \pm 0.09$  มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ก่อนที่จะเริ่มลดลงในชั่วโมงที่ 72 ซึ่งมีปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ลดลงต่ำสุดถึง  $1.434 \pm 0.03$  มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร เป็นระยะเวลาเดียวกันที่จำนวนเซลล์เพิ่มขึ้นสูงสุด โดยมีจำนวนเซลล์เท่ากับ  $2.4 \times 10^7$  เซลล์ต่อมิลลิลิตร หลังจากนั้นจำนวนเซลล์ค่อยๆ ลดลงเมื่อระยะเวลาในการเลี้ยงเพิ่มขึ้น

สำหรับค่าความเป็นกรดต่างเริ่มลดลงตั้งแต่ชั่วโมงที่ 24 และยิ่งลดลงเมื่อระยะเวลาในการเลี้ยงเพิ่มขึ้น โดยค่าความเป็นกรดต่างลดลงต่ำสุดชั่วโมงที่ 120 ซึ่งมีค่าความเป็นกรดต่างที่ 5 ส่วนปริมาณแอลกอฮอล์ของเชื้อ BS 6-2 ในอาหารเลี้ยงเชื้อกากขานอ้อยใน SM30 ที่ทำการกรอกก่อนนำเข้าเครื่องหมักหนึ่งความดันอัตโนมัติ นั้นไม่พบปริมาณแอลกอฮอล์ตั้งแต่ชั่วโมงแรกถึงชั่วโมงที่ 120

จากความแตกต่างขององค์ประกอบในอาหารเลี้ยงเชื้อมีผลให้การเจริญของเซลล์แตกต่างกัน โดยเชื้อ BS 6-2 มีจำนวนเซลล์สูงที่สุดชั่วโมงที่ 72 ซึ่งเป็นระยะเวลาเดียวกันกับที่ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ลดลงต่ำ และเมื่อระยะเวลาในการเลี้ยงเพิ่มขึ้นค่าความเป็นกรดต่างเริ่มลดลง จากการเลี้ยงเชื้อ เมื่อครบ 120 ชั่วโมงพบว่าจำนวนเซลล์ในอาหารเลี้ยงเชื้อกากขานอ้อยใน SM30 ที่ทำการกรอกกากขานอ้อยออกก่อนนำเข้าเครื่องหมักหนึ่งความดันอัตโนมัติให้จำนวนเซลล์สูงสุด โดยเชื้อ BS 6-2 มีจำนวนเซลล์  $2.06 \times 10^6$  เซลล์ต่อมิลลิลิตร จากการวิเคราะห์ทางสถิติพบว่าอาหารเลี้ยงเชื้อกากขานอ้อยทั้ง 2 สูตรและอาหารเลี้ยงเชื้อ YM มีจำนวนเซลล์แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ( $p < 0.05$ )

## บทที่ 5 สรุปและวิจารณ์ผล

สำหรับการเลี้ยงเชื้อแอสโคไมซีตาจากที่แยกได้ใหม่ ที่ป่าชายเลนจังหวัดนครศรีธรรมราช หรือที่แยกได้ก่อนหน้านี้ การเลี้ยงในอาหาร ISP2 จะสังเกตได้ว่าเชื้อแอสโคไมซีตาเจริญได้ดีมากเป็นส่วนใหญ่ และแอสโคไมซีตาที่สร้างรงควัตถุได้ ก็สามารถสร้างได้ดีมากกว่าในการเลี้ยงด้วยอาหารชนิดอื่น ๆ แอสโคไมซีตาที่สร้างรงควัตถุได้นั้น ส่วนมากรงควัตถุที่สร้างก็สามารถออกฤทธิ์ยับยั้งจุลินทรีย์ได้ด้วย เช่น ใน A1-3, A3-3, A16-1 เป็นต้น อาหารเลี้ยงเชื้อเป็นปัจจัยหนึ่งที่สำคัญที่จะทำให้แอสโคไมซีตา เจริญดี และสร้างสารออกฤทธิ์ได้มาก

ส่วนการเลี้ยงในอาหารที่มี pH ต่าง ๆ กันนั้น พบว่าแอสโคไมซีตาส่วนมากแล้วสร้างสารออกฤทธิ์ได้ในทุก ๆ ค่า pH เว้นแต่จะสร้างได้มาก หรือน้อย ที่ค่า pH ในอาหาร 7.5-8.0 แอสโคไมซีตาส่วนใหญ่ที่นำมาทดสอบนั้นสามารถสร้างสารยับยั้งจุลินทรีย์ทดสอบ (MRSA 21, MRSA 22, MRA39 และ *C. albicans*) ไม่แตกต่างกัน เช่น Actinomycetes NS5-3, NS1-4, NS4-6 NS 6-2 เป็นต้น และที่ ค่า pH สูงมากขึ้น ระบุว่า pH 8.0- pH 9.0 ก็ยังมีบางไซเลตสร้างสารออกฤทธิ์ได้ไม่แตกต่างกัน เช่น แอสโคไมซีตา NS 6-2, NS4-1 ส่วนที่ pH ในอาหารไม่ว่าจะเป็นเท่าใดในช่วง pH 7.0-pH 9.0 ไม่มีผลต่อการสร้างสารเท่าใดนัก ได้แก่ไซเลต NS4-6 และ NS6-2 ซึ่งการทดสอบค่า pH ในอาหารนี้ทดสอบจากแอสโคไมซีตาทั้งหมด 7 ไซเลต

จากที่แยกเชื้อแอสโคไมซีตาได้ใหม่ ที่ป่าชายเลนจังหวัดนครศรีธรรมราช รวมทั้งหมด 52 ไซเลตนั้น เมื่อนำมาทดสอบเบื้องต้นในการสร้างสารออกฤทธิ์ยับยั้งจุลินทรีย์พบว่า มี 27 ไซเลต ที่สามารถสร้างสารออกฤทธิ์ได้ ไม่ทั้งต่อจุลินทรีย์แกรมบวก และ *C. albicans* ก็ยับยั้งอย่างใดอย่างหนึ่ง คิดเป็น 51.92 % นับว่าเป็นเปอร์เซ็นต์ที่สูง

การศึกษารูปร่างลักษณะทางสัณฐานวิทยาของแอสโคไมซีตาที่แยกได้ใหม่นั้น ทั้งภายใต้กล้องจุลทรรศน์ธรรมดา และกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนพบว่า แอสโคไมซีตาส่วนใหญ่ที่ได้ เป็นแอสโคไมซีตา ซึ่งมีลักษณะเส้นสายของสปอร์เป็นชนิดบิดเป็นเกลียว (spiral) หรือเป็นห่วง(loop) หรือ Rectiflexible ในจีนัส *Streptomyces* รองลงมา คือแอสโคไมซีตาในจีนัส *Micromonospora* ซึ่งสร้างโคโลนีสีดำ หรือน้ำตาลเข้ม ไม่มี aerial mycelium สร้างสปอร์เดี่ยว ๆ บนเส้นใย

สำหรับยีสต์ การเจริญในอาหารสังเคราะห์สำเร็จรูป (YM) นั้น ยังคงเจริญได้ดีมากกว่า ในอาหารธรรมชาติ (กากชานอ้อย) ทั้งนี้เนื่องจากในอาหารสำเร็จรูป (YM) นั้นมีสารอาหารมากกว่า และเป็นอาหารที่เหมาะสม ยีสต์จึงเจริญได้ดี กากชานอ้อยมีสารอาหารน้อยกว่า มีน้ำตาลน้อยมาก แต่ยีสต์ยังมีการเจริญได้เมื่อน้ำตาลหมด อาจเนื่องจากยีสต์มีเอนไซม์หลายชนิด รวมทั้งเอนไซม์ที่สามารถสลายเซลลูโลส ในกากชานอ้อย จึงยังสามารถเจริญได้อีกกระยะหนึ่ง จนกว่าน้ำตาลหรือสารอาหารที่ใช้ได้จะหมดลง

เอกสารอ้างอิง

เอกสารอ้างอิงของโครงการวิจัย

- Anzai, K., Nakashima, T., Kuwahara, N., Suzuki, R., Ohfuku, Y., Takeshita, S. and Ando, K. 2008. Actinomycete bacteria isolated from the sediments at coastal and offshore Area of Nagasaki Prefecture, Japan: Diversity and Biological Activity. *Journal of Bioscience and Bioengineering*. 106:215-217.
- Bérdy, J. 2005. Bérdy, Bioactive microbial metabolites. *J. Antibiot.*, 58 (2005), pp. 1-26. Chi, Z., Liu, Z., Gao, L., Gong, F., Ma, C., Wang, X., and Li, H. 2006. Marine yeasts and their applications in Mariculture. *J. Ocean University of China*. 5: 251-256
- Bredholt, H., Galatenko, O. A., Engelhardt, K., Fjaervik, E., Terekhova, L. P. and Zotchev, S. B. (2007). Rare actinomycetes bacteria from the shallowwater sediments from of the Trondheim fjord, Norway: Isolation, diversity and biological activity. *Environmental Microbiology*. 9:2756-2764.
- Bull, A. T., Stach, J. E.M., Ward, A. C. and Goodfellow, M 2005. Marine actinobacteria: perspectives, challenges, future directions. *Antonie Van Leeuwenhoek*. 87:65-79.
- Cragg, G.M. 2007. Natural products as sources of new drugs over the last 25 years. *J.Nat. Prod.*, 70, 461-477.
- Das, S., Lyla, P. S. and Khan, S. A. 2008. Distribution and generic composition of culturable marine Actinomycetes from the sediments of Indian continental slope of Bay of Bengal. *Chinese J. of Oceanology and Limnology*. 26: 166-177
- Fiedler, H.-P., Bruntner, C., Bull, A.T., Ward, A.C., Goodfellow, M., Potterat, O., Puder, C. and Mihm, G. (2005) Marine actinomycetes as a source of novel secondary metabolites. *Antonie van Leeuwenhoek* 87:37-42.
- Hong, K., Gao, A-H., Xie, Q-Y., Gao, H., Zhuang, L., Lin, H-P., Yu, H-P., Yao, S-H., Goodfellow, M., and Ruan, J-S. 2009. Actinomycetes for marine drug discovery isolated from mangrove Soils and plants in China. *Marine Drugs*. 7:24-44
- Ekwealor, I. A., and Obeta, J. A. N. 2006. Screening of UV-irradiated and S-2-aminoethyl-L-Cystein resistant matants of *Bacillus megaterium* for improved lysine accumulation. *African J. of Biotechnology*. 5: 2312-2314

579.177  
5377D  
2.4

346963

- Jensen, P.R., R. Dwight and W. Fenical, 1991. Distribution of actinomycetes in near-shore tropical marinesediments. *Applied Environmental Microbiology*. 57: 1102-1108.
- Jensen, P. R., Gontang, E., Mafnas, C., Mincer, T. J. and Fenical, W. 2005a. Culturable marine actinomycete diversity from tropical Pacific Ocean sediments. *Environ Microbiol*. 7:1039-1048.
- Jensen, P.R., Mincer, T. J., Williams, P. G. and Fenical, W. 2005b. Marine actinomycete diversity and natural product discovery. *Antonie Van Leeuwenhoek* . 87:43-48.
- Jimenez, J. T., Šturdíková, M. and Šturdíka, E.. 2009. Natural products of marine origin and their perspectives in the discovery of new anticancer drugs. *Acta Chimica Slovaca*. 2: 63 – 74
- Fiedler, H-P., Bruntner, C., Bull, A. T., Ward, A. C., Goodfellow, M., Potterat, O., Puder, C. and Mihm, G. 2005. Marine actinomycetes as a source of novel secondary metabolites. *Antonie Van Leeuwenhoek*. 87:37-42.
- Kelman, D., Hill, R. T., Rosenberg, E., Kashman, Y., Ilan, H., and Loya, Y. 2005. Association of Microorganisms with Bioactive Marine Sponges is Facilitated by Resistance to Antibiotics. *In: Proceeding of the International Marine Biotechnology Conference*. 7-12 June, 2005. St. John's, Newfoundland, Canada.
- Kumar, K. S., Haritha, R., Jagan Mohan, Y.S.Y.V. and Ramana, T. 2011. Screening of Marine Actinobacteria for Antimicrobial Compounds. *Research Journal of Microbiology*, 6: 385-393.
- Maldonado, L.A., Stach, J.E.M., Pathom-aree, W., Ward, A.C., Bull, A.T. and Goodfellow, M. (2005). Diversity of cultivable actinobacteria in geographically widespread marine sediments. *Antonie van Leeuwenhoek*. 87: 11-18
- Nussbaum, F.V., Brands, M., Hinzen, B., Weigand, S. and Habich, D. 2006. ,Antibacterial natural products in medicinal chemistry – exodus or revival? *Angew. Chem. Int. Ed.* 45, 5072–5129. Newman, D.J.;
- Newman, D.J.; Cragg, G.M. 2007. Natural products as sources of new drugs over the last 25 years. *J.Nat. Prod.*, 70, 461–477.
- Hosoya, Y., Okamoto, S., Muramatsu, H. and Ochi, K. 1998. Acquisition of Certain Streptomycin-Resistant (*str*) Mutations Enhances Antibiotic Production in Bacteria. *Antimicrob Agents Chemother*. 42: 2041-2047.

- Magarvey, N. A., Keller, J. M., Bernan, V., Dworkin, M. and Sherman, D. H. 2004. Isolation and characterization of novel marine-derived actinomycete taxa rich in bioactive metabolites. *Appl Environ Microbiol.* 70:7520-7529.
- Solanki, R., M. Khanna and R. Lal, 2008. Bioactive compounds from marine actinomycetes. *Indian Journal of Microbiology.* 48: 410-431.
- Solano, G., Rojas-Jiménes, K., Jaspars, M and Tamayo-Castillo, G. 2009. Study of the diversity of culturable actinomycetes in the North Pacific and Caribbean coasts of Costa Rica *Antonie van Leeuwenhoek.* 96: 71-78.
- Stach, J. E. M., Maldonado, L. A., Ward, A. C., Bull, A. T., and Goodfellow, M. 2004. *Williamsia maris* sp. nov., a novel actinomycete isolated from the Sea of Japan. *Int J Syst Evol Microbiol* 2004, 54:191-194
- Veerapagu, M., Jeya, K.R., and Ponmurugan, K.2008. Mutational effect of *Penicillium chrysogenum* on antibiotic Production. *Advance Biotechnol.* July:16-19
- Weyland, H. 1986. Actinomycetes of the Bottom sediments of various sea . *Actes de Colloques.* 3: 73-79
- Zotchev S. B. 2012. Marine actinomycetes as an emerging resource for the drug development pipeline. *Journal of Biotechnology.* 158: 168-175

ภาคผนวก

ผลจากการวิเคราะห์ลำดับเบส ของ rRNA ยีน ของงวงแอกติโนมัยซีที่ให้อุทริยัมยั้งจุลินทรีย์ และสารต้านอนุมูลอิสระ

16S rDNA sequence

A16-1

CGTCAGGACGAACGCTGGCGGCGTGCTTAACACATGCAAGTCGAACGATGAAGCCCTTCG  
GGGTGGATTAGTGGCGAACGGGTGAGTAACACGTGGGCAATCTGCCCTGCACTCTGGGAC  
AAGCCCTGGAACGGGGTCTAATACCGGATACTGACCATCTTGGGCATCCTTGATGGTGG  
AAAGCTCCGGCGGTGCAGGATGAGCCCGCGGCCTATCAGCTAGTTGGTGAGGTAATGGCT  
CACCAAGGCGACGACGGGTAGCCGGCCTGAGAGGGCGACCGGCCACACTGGGACTGAGAC  
ACGGCCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATATTGCACAATGGGCGAAAGCCTG  
ATGCAGCGACGCCGCGTGAGGGATGACGGCCTTCGGGTTGTAAACCTCTTTCAGCAGGGA  
AGAAGCGAAAGTGACGGTACCTGCAGAAGAAGCGCCGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGC  
GGTAATACGTAGGGCGCGAGCGTTGTCCGGAATTATTGGGCGTAAAGAGCTCGTAGGCCG  
CTTGTGCGGTCGGTTGTGAAAGCCCGGGGCTTAACCCCGGGTCTGCAGTCGATACGGGCA  
GGCTAGAGTTCGGTAGGGGAGATCGGAATCCTGGTGTAGCGGTGAAATGCGCAGATATC  
AGGAGGAACACCGGTGGCGAAGGCGGATCTCTGGGCCGATACTGACGCTGAGGAGCGAAA  
GCGTGGGGAGCGAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCGTAACGGTGGGCACTA  
GGTGTGGGCAACATTCCACGTTGTCCGTGCCGACGCTAACGCATTAAGTGCCCCGCCTGG  
GG-AGTACGGCCGCAAGGCTAAAACCTCAAAGGAATTGACGGGGGCCCGCACAAAGCGGCGG  
AGCATGTGGCTTAATTCGACGCAACGCGAAGAACCTTACCAAGGCTTGACATACACCGGA  
AACGTCCAGAGATGGGCGCCCCCTTGTGGTGGTGTACAGGTGGTGCATGGCTGTCTGCA  
GCTCGTGTCTGAGATGTTGGGTTAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCTTGTCCCGTGTG  
CCAGCAGGCCCTTGTGGTGTCTGGGACTCACGGGAGACCGCCGGGGTCAACTCGGAGGAA  
GGTGGGGGACGACGTCAAGTCATCATGCCCTTATGTCTTGGGCTGCACACGTGCTACAA

TGGCCGGTACAATGAGCTGCGATACCGCGAGGTGGAGCGAATCTCAAAAAGCCGGTCTCA  
GTTCCGAATTGGGGGTCTGCAACTCGACCCCATGAAGTCGGAGTCGCTAGTAATCGCAGA  
TCAGCATTGCTGCGGTGAATACGTTCCCGGGCCTTGTACACACCGCCCGTCACGTCACGA  
AAAGTCGGTAACACCCGAAAGCCGGTGGCCCAACCCCTTGTGGGAAAGGAGCTGTCGAAA  
GTGGGACTGGCGATTGGACA

## **Anti-MRSA and antioxidant activities of actinomycetes isolated from marine sponges [Poster]**

Srivibool, Rattanaporn\*<sup>1</sup>, Rawiwan Watanadilok<sup>1</sup> and Subuntith Nimrat<sup>2</sup>

1 Institute of Marine Science, Burapha University, Chonburi 20131 Thailand.

2 Department of Microbiology, Faculty of Science, Burapha University, Chonburi 20131 Thailand.

*rattanap@buu.ac.th*

Sixteen samples of marine sponges were collected at Wangnok island, Nakhon Sithamarat Province, to isolate for actinomycetes. Isolation media were ISP2 (International *Streptomyces* Project 2), actinomycete isolation agar and starch casein agar. Each sample of sponge was ground with normal saline before the fine suspension was inoculated and spread onto the medium plates, triplicately. The plates were incubated at 30° C for 4 weeks observation. Two isolates of actinomycetes, *Micromonospora* POR 02(MP02) and *Micromonospora* POR 06 (MP06) were found from *Chalinidia* sp. and *Dysidea* sp., respectively. Both isolates were found to be antimicrobial producing strains against methicillin resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) and *Bacillus subtilis*. Crude extract products were prepared from both cells and cultured medium of MP02 and MP 06. Interestingly, by disc diffusion assay, all of 23 hospital strains of tested MRSA were inhibited by methanol crude extract from cells of MP 06 which showing a small difference of inhibition distance zone to that of vancomycin (45 µg/disc). The MIC<sub>50</sub> of (medium) MP02 and (cell) MP06 crude extracts to MRSA SP83 showed the same range, 64-128 µg/ml, while MIC<sub>50</sub> of (cell) MP02 crude extract ranging from 128-256 µg/ml. Antioxidant activity was assessed on the basis of scavenging effect on stable 1, 1-Diphenyl-2-Picryl Hydrazyl (DPPH) free radicals. We found that the crude ethyl acetate extract from growth medium of MP06, but not MP02, showed good antioxidant activity compared to that of ascorbic acid. Although not many actinomycetes were found from sponges, but the recovered isolates were rather promising to study further some other bioactive metabolites.

## Anti-MRSA Activity of *Streptomyces* A16-1 An Isolate From Coastal Soil.

<sup>1</sup>Rattanaporn Srivibool and <sup>2</sup>Subuntith Nimrat

(<sup>1</sup>Institute of Marine Science, Burapha University, Chonburi 20131, Thailand. <sup>2</sup> Faculty of Science, Burapha University, Chonburi, 20131, Thailand.)

---

### Abstract

Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*, MRSA, is any strain of *Staphylococcus aureus* that has developed resistance to beta-lactam antibiotics, which include the penicillins (methicillin, dicloxacillin, nafcillin, oxacillin, etc.) and the cephalosporins. It is also called multidrug-resistant *Staphylococcus aureus* and oxacillin-resistant *Staphylococcus aureus* (ORSA) and difficult to be treated in several infections in humans. *Streptomyces* A16-1, an antimicrobial producing strain, isolated from coastal soil was cultured on ISP2 (International Streptomyces Project 2) medium for 3 days before anti-MRSA activity was investigated by cross streak method. Thirty strains of MRSA isolated from pus, sputum and hemolymph of patients were test organisms. The result showed that all the MRSA tested strains were inhibited by *Streptomyces* A16-1, except MRSA SP83. Ethyl acetate crude product of *Streptomyces* A16-1 separated by TLC and bioautography assay revealed that the strain produces many active compound against MRSA SP22. Partial purification of the crude product was carried on by silica gel column chromatography and 21 fractions were collected. After concentrated, anti-MRSA activity of each fraction was detected by bioautography assay. It was revealed that 6 components of fraction 6, 5 components of fractions 7-9 and 2 components of fractions 10-12, and fraction 5 were active components against MRSA P45. All the results showed that *Streptomyces* A16-1 produced many active compounds against various strains of MRSA isolated from patients. By 16S rRNA gene sequence analysis and by morphological studies, *Streptomyces* A16-1 was 98.961% similar to *Streptomyces spinoverrucosus*.

**KEYWORDS:** Anti-MRSA, Actinomycetes, Streptomyces, MRSA

---

Corresponding Author, E-mail: rattanap@buu.ac.th

Proceeding เสนอผลงานในการประชุม International Conference on Microbial Taxonomy, Basic and Applied Microbiology ครั้งที่ 1, 4-6 October, 2012, Khon Kaen.

## Introduction

Staphylococci are amongst the most hardy of the nonspore forming bacteria and can survive significant adverse environmental conditions. They can be easily cultured from desiccated clinical material, even after several months, are relatively heat-resistant and can tolerate high salt concentrations. *S. aureus* is one of the most prevalent of this genus and has been a recognized pathogen in humans for centuries (Wad Vogel, 2000).

MRSA is any strain of *Staphylococcus aureus* that has developed resistance to methicillin antibiotics, which include the penicillins (methicillin, dicloxacillin, nafcillin, oxacillin, etc.) and the cephalosporins. Strains unable to resist these antibiotics are classified as methicillin-sensitive *Staphylococcus aureus*, or MSSA. The development of such resistance does not cause the organism to be more intrinsically virulent than strains of *S. aureus* that have no antibiotic resistance, but resistance makes MRSA infection more difficult to treat with standard types of antibiotics and thus more dangerous.

Generally, reservoir of *S. aureus* in human body is the anterior nares, although other sites such as the groin, axillae and perineal area have been described as well. Approximately 20% to 40% of the adult population may be colonized at any given time, depending on a number of local and epidemiological factors. On an individual basis, about 30% of the adult population will be chronic carriers, 50% will be intermittent carriers and another 20% do not seem to become colonized. If the mucous membranes or the skin barrier are breached from trauma or surgical intervention, *S. aureus* may enter the soft tissues and establish an invasive infection. This background make us understand why *S. aureus* continues to be a major human pathogen that infects both healthy hosts in the community as well as compromised hosts in the hospital (Payne, et al., 1996; Sanford, et al., 1994).

The emergence of MRSA in Canada is a phenomenon in last 2 decades, raising considerable concern because this type of *S. aureus* would cause infections difficult to treat in the outpatient (Conly, et al., 2003). In Thailand, the National Antimicrobial Resistance Surveillance Thailand (NARST) program, studied an overview of the antimicrobial susceptibility patterns of important Gram-positive bacteria from between 2000 and 2005 as well as the clinical implications. It was found a constant occurrence of methicillin-resistant *S. aureus* (MRSA) was noted during this period (Mootsikapun et al., 2009). NARST reported that MRSA contributes significantly to either healthcare-associated or hospital acquired infections in Thailand. Further more, MRSA is also associated with community-acquired infections in western countries. The data of NARST surveillance indicated that MRSA constantly contributed 24% to 27% of all *S. aureus* clinical isolates from most hospitals during the study period, except from certain university hospitals where the percentage ranging between 30% and 60%. Thus, from now on searching for more other type of antibiotics to conquer MRSA would be an urgent task.

Actinomycetes are well known having produced thousands of bioactive compounds. In the past two decades, however, there has been a decline in the discovery of new lead compounds from common soil-derived actinomycetes. Recently scientists started searching various extreme ecosystems such as deep sea, forest, mountains and deserts for the discovery of novel actinomycetes and novel antibiotic compounds (Jensen, et al., 2005; Valan, et al., 2008;

Radhakrishnan, et al., 2007). The purpose in this present study was to find new antibiotics or bioactive compounds from actinomycetes isolated from Thai coastal soil.

Naorungrote, et al. (2011) reported that out of different 64 isolates of *Actinomycetes* isolated from soil samples in Nakhon Si Thammarat, 19 exhibited anti-MRSA activity in which 10 isolates could inhibit all tested MRSA. Some isolates exhibited the anti-MRSA activities on both agar plug and agar well diffusion methods and from taxonomic studies all these isolates belong to *Streptomyces*: *Streptomyces* sp. CFJ2, *Streptomyces antibioticus* strain 1022-257, *Streptomyces flaveolus* strain NRRL B-1334, *Streptomyces psammoticus* strain NBRC 13971 and *Streptomyces* sp. b26 (Naorungrote, 2011). Up to present, actinomycetes still be a prominent group and promising bacteria for scientists to search for novel antibiotics and other new effective bioactive compounds.

## Experimental and Methods

### 1. Isolation and purification of Actinomycetes

*Streptomyces* A16-1 was isolated from tropical coastal soil in Chonburi Province, Thailand, on Starch Casein Agar. The soil was pretreated at 55 °C for 30 min before spreading on the agar medium, then incubated at 32 °C for a week. The colony was purified on the same medium after appearing on the isolation plate, kept at room temperature, 25 °C, for further studies and preserved in 20% glycerol at -40 °C.

### 2. Preparation of MRSA test strains.

All tested MRSA were isolated from patients' specimens: pus-, sputum-, urine- and haemo-culture, and classified by standard method as described in Holt et al. (1986), Colle et al. (1996) and Hakim et al. (2007). Tested MRSA were streaked on Tryptic Soy Agar, incubated at 30°C for 24 hours and concentration adjusted as 0.5 Mcfarland ( $10^8$  CFU/ml) in Tryptic Soy Broth before use.

### 3. Preliminary anti-MRSA activity study.

Anti-MRSA activity was investigated by cross streak method after *Streptomyces* A16-1 was cultured on ISP2 (International *Streptomyces* Project 2) medium for 4 days and extended the incubation time for another day before the result was read.

### 4. Extraction and partial purification of crude bioactive compounds.

*Streptomyces* A16-1 was cultured in ISP2 broth, 100 rpm reciprocal shaken, at 30 °C for 10 days. Separated cells and medium by centrifugation before crude compounds were extracted by methanol and ethyl acetate, respectively. The crude compounds were preliminary separated by thin-layer chromatography on silica gel plate. Partial purification of the crude product was continued through silica gel column chromatography, eluted by chloroform, chloroform:methanol = 95:5, 90:10, 80:20 and 70:30, respectively. Fractions were collected, 50 ml each, and solvents were concentrated by evaporation.

### 5. Bioautography assay study.

Antimicrobial activity to MRSA of the partially purified compound from TLC was tested by bioautography method. The concentrated crude, partial purification, products were spot on TLC (Silica Gel 60, 4x4.5 cm), separated

with chloroform and methanol and placed on agar medium plates pre-swabbed with MRSA P45. Left the separated component spots well absorbed at 4° C for 4 h and incubated for another 24 h after the chromatograms were taken out, and the inhibition zones on agar plates were observed.

#### 6. Morphology and molecular studies.

*Streptomyces* A16-1 was streaked on ISP2 medium plate, incubated at 32° C for 3-4 days and examined both under inverted light microscopy and scanning electron microscopy. Aerial, substrate mycelium and spore chain type, including ultra structures of the strain were noticed. Molecular study was performed by analysis of 16S rRNA gene sequencing and the BLAST matching from GenBank sequences data base.

## Results and Discussion

Preliminary test for anti-MRSA activity of *Streptomyces* A16-1 to 29 strains of MRSA: MRSA SP1, MRSA SP5, MRSA U7, MRSA P9, MRSA H16, MRSA SP21, MRSA SP22, MRSA SP27, MRSA SP31, MRSA SP37, MRSA SP39, MRSA SP41, MRSA SP45, MRSA SP47, MRSA SP58, MRSA SP61, MRSA SP64, MRSA P65, MRSA H78, MRSA SP78, MRSA SP79, MRSA SP83, MRSA P86, MRSA SP86, MRSA SP89, MRSA P90, MRSA SP117, MRSA SP120, and MRSA SP138 revealed clear inhibition zone mostly in range of 10-15 mm from the *Streptomyces* streak. Only MRSA SP86, MRSA SP78 and SP 41 that inhibition zones were lesser from the range, 4 mm, 6 mm, and 7mm respectively. Partial purification of the crude product gave 21 fractions, but fraction 7-9, 10-12, 13-16, 17-19 and 20-21 showed similar pattern of components on chromatograms. Anti-MRSA P45 activity was revealed by bioautography assay. Six and 5 component spots from fraction 6 and fraction 7-9 showed anti-MRSA activity, 2 component spots from fraction 5 and fraction 10-12 as well. These data indicated that *Streptomyces* A16-1 produced many bioactive compounds inhibited to various sources of MRSA. Data from morphological and molecular studies revealed *Streptomyces* A16-1 having 98.961% similarity to *Streptomyces spinoverrucosus*

## Conclusions

As *Streptomyces* A-16-1 capably well inhibited all MRSA tested isolates, it is a promising strain to be developed for further anti-MRSA antibiotic production or for further pharmaceutical study.

## Acknowledgements

The Institute of Marine Science and colleagues in Marine Biotechnology Unit were to be acknowledged for all facilities and helpful cooperation. The research grant was supported by NRCT through government budget.

## References

Conly, J. M., and Johnston, B. L. (2003) The emergence of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* as a

- community-acquired pathogen in Canada. *Can J Infect Dis.* 2003 Sep-Oct; 14(5): 249-251.
- Colle, J.G., Frasher, A. G., Marmion, B. P., Simmon, A. (1996) *Makie and McCartney's Practical Medical Microbiology*, 14th edn. Churchill Livingstone, pp. 254-256 & pp. 796-800.
- Frey, R. G. (1980). *Interests and Rights: the Case against Animals*. Oxford: Clarendon Press. pp. 11-22.
- Ozaki, M., Adachi, Y., Iwahori, Y. and Ishii, N. (1998). Application of Fuzzy Theory to Writer Recognition of Chinese Characters. *International Journal of Modeling and Simulation.* 18(2): 112-116.
- Hakim, S.T., Arshed, S., Iqbal, M., *et al.* (2007) Vancomycin sensitivity of *Staphylococcus aureus* isolates from hospital patients in Karachi, Pakistan. *Libyan Journal of Medicine, AOP: 070624* 2007; 1-6.
- Holt J. G., Sneath, P.H., Mair, N.S., *et al.* (1986). *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*, Volume 2. Baltimore: Williams & Wilkins
- Jenson, P.R., Mincer, T.J., Williams, P.G., Fenical, W.(2005). Marine actinomycete discovery and natural product discovery. *Antonie van Leeuwenhoek.* 87:43-8.
- Mootsikapun, P., Trakulsomboon, S., Sawanpanyalert, P., Aswapokee, N., and Suankratay, C. (2009) An overview of Antimicrobial Susceptibility Patterns of Gram-Positive Bacteria from National Antimicrobial Resistance Surveillance Thailand (NARST) Program from 2000 to 2005 *J Med Assoc Thai* 2009; 92 (Suppl 4): S87-90
- Naorungrote, S., Chunglok, W., Lertcanawanichakul, M., and Bangrak, P.(2011). Actinomycetes Producing Anti-Methicillin Resistant *Staphylococcus aureus* from Soil Samples in Nakhon Si Thammarat. *Walailak Journal of Science and Technology.* 8:
- Payne, M.C., Wood, H.F., Karakawa, W., Gluck, L. (1996) A prospective study of staphylococcal colonization and infections in newborns and their families. *Am J Epidemiol.* 82:305- 16.
- Radhakrishnan M, Balaji S, Balagurunathan R. Thermotolerant actinomycetes from the Himalayan Mountains- Antagonistic potential, characterization and identification of selected strains. *Malay Appl Biol* 2007;36:59-65.
- Sanford, M.D., Widmer, A.F., Bale, M.J., Jones, R.N., Wenzel, R.P.(1994) Efficient detection and long-term persistence of the carriage of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Clin Infect Dis.* 19:1123-8.
- Sata, T. (1971). New identification methods for manufacturing processes. In: Peklenik, J., Ed. *Advances in Manufacturing Systems Research and Development*. Oxford: Pergamon Press. pp. 11-22.
- Valan AM, Duraipandian V, Agastian P, Ignacimuthu. Antimicrobial activity of *Streptomyces* spp. ERI-26 recovered from Western Ghats of Tamil Nadu. *J Med Mycol* 2008;18:147-53.
- Wad Vogel, F.A. (2000) *Staphylococcus aureus* (including staphylococcal toxic shock). In: Mandell GL, Bennett JE, Dolin R, editors. *Principles and practice of infectious diseases*. 5th ed. Philadelphia: Churchill Livingstone, pp. 2069-92.